



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK ŘASAMI A  
KVASINKAMI KULTIVOVANÝMI NA RŮZNÝCH ZDROJÍCH  
ŽIVIN**

PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES BY YEASTS AND ALGAE CULTIVATED ON  
DIFFERENT NUTRITION SOURCES

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Darina Kohútová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1440/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Darina Kohútová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

### Název bakalářské práce:

Produkce biologicky aktivních látek řasami a kvasinkami kultivovanými na různých zdrojích živin

### Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je sledování produkce aktivních látek vybraných druhů kvasinek a řas kultivovaných na různých zdrojích uhlíku a dusíku.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na využívání různých nutričních zdrojů karotenogenními kvasinkami a autotrofními řasami
- 2) kultivace vybraných druhů kvasinek a řas na různých kombinacích zdrojů C a N včetně odpadních substrátů
- 3) stanovení růstových a produkčních charakteristik studovaných kmenů
- 4) srovnání vlivu typu nutričního zdroje na produkci biomasy a vybraných metabolitů u studovaných kvasinek a řas.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Darina Kohútová  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Karotenoidy sú lipofilné pigmenty a zároveň najrozšírenejšie antioxidanty vyskytujúce sa v prírode s veľkým uplatnením v kozmetickom, farmaceutickom a potravinárskom priemysle. Lipidy sú jednými zo základných organických látok živých organizmov, sú zdrojom a zásobou energie. Táto práca sa zaoberala optimalizáciou nutričných vlastností médií na kultiváciu karotenogénnych kvasiniek a rias. Boli aplikované rôzne zdroje dusíka, koncentrácie NaCl, rôzne pomery uhlíka ku dusíku v médiu a dva odpadné substráty. Získaná biomasa bola analyzovaná chromatograficky a boli vyhodnotené produkcie karotenoidov, ergosterolu, koenzýmu Q a lipidov. Zo skúšaných zdrojov dusíka pre kvasinky bola najpriaznivejšia močovina, pre riasy najčastejšie dusičnan sodný. Vyššia koncentrácia soli zle vplývala na rast kvasiniek, ale zvyšovala nenasýtenosť mastných kyselín. Výsledky pri skúšaných pomeroch C/N boli rôzne, pomer 16 bol najvhodnejší na rast, ale zvyšujúci sa C/N pomer zvyšoval podiel polynenasýtených mastných kyselín. Z použitých kmeňov kvasiniek mala najlepšie produkčné schopnosti *Rhodotorula mucilaginosa* a *Sporidiobolus salmonicolor*, z použitých kmeňov rias rod *Chlorella*.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Karotenoidy, lipidy, kvasinky, nutričný stres, odpadné substráty

## ABSTRACT

Carotenoids are lipophilic pigments and the most widespread antioxidants occurring in nature with great application potential in the cosmetics, pharmaceuticals and food industry. Lipids are one of the essential organic substances of living organisms as a nutrition source and energy supply. This work deals with the optimalization of nutritional characteristics of cultivation medium for cultivation of carotenogenic yeasts and algae. Two waste substrates were used and different nitrogen sources, NaCl concentrations, and various C/N ratios were applied. The biomass obtained was analysed by chromatography, and the production of carotenoids, ergosterol, coenzyme Q and lipids was evaluated. Of the tested nitrogen sources urea was the most favourable for yeasts, and sodium nitrate for algae. Higher salt concentration had a negative effect on yeast growth but increased degree of fatty acid unsaturation. Tested C/N led different effects: while the C/N ratio 16 most suitable for growth, the increasing C/N ratio caused the increase of the polyunsaturated fatty acids content. Of the used yeast strains, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Sporidiobolus salmonicolor* exhibited the best production characteristics, of the used algae strains, it was *Chlorella*.

## KEYWORDS

Carotenoids, lipids, yeast, nutritional stress, waste substrates

KOHÚTOVÁ, Darina. *Produkce biologicky aktivních látek řasami a kvasinkami kultivovanými na různých zdrojích živin*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115843>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

### **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so zvoľením vedúceho práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študentky

### **PodĎakovanie**

Rada by som sa poďakovala vedúcej tejto práce prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc. za odbornú pomoc a motiváciu, môjmu konzultantovi Ing. Martinovi Szotkowskému za rady, trpezlivosť a ochotu pomôcť. V neposlednom rade by som chcela spomenúť moju rodinu, bez ktorej by som nemohla študovať a môjho priateľa, ktorý mi je najväčšou oporou.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická časť .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Karotenoidy .....</b>	<b>9</b>
2.1.1	Chemická štruktúra a vlastnosti .....	9
2.1.2	Funkcie v organizmoch .....	9
2.1.3	Biosyntéza karotenoidov .....	10
2.1.4	Biotechnologická produkcia karotenoidov .....	10
2.1.5	$\beta$ -karotén .....	11
<b>2.2</b>	<b>Ubichinón .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Ergosterol .....</b>	<b>12</b>
2.3.1	Ergokalciferol .....	13
<b>2.4</b>	<b>Pyrrolové rastlinné farbivá .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5</b>	<b>Komplexné lipidy .....</b>	<b>14</b>
2.5.1	Funkcia lipidov v organizmoch .....	14
2.5.2	Mastné kyseliny .....	14
2.5.3	Acylglyceroly .....	15
2.5.4	Odbúvanie lipidov .....	15
2.5.5	Biosyntéza lipidov .....	16
2.5.6	Biosyntéza triacylglycerolov .....	17
<b>2.6</b>	<b>Karotenogénne mikroorganizmy .....</b>	<b>17</b>
2.6.1	Karotenogénne kvasinky .....	17
2.6.2	Mikroriasy .....	19
<b>2.7</b>	<b>Odpadné substráty .....</b>	<b>21</b>
2.7.1	Perie .....	21
2.7.2	Srvátka .....	22
<b>2.8</b>	<b>Analytické metódy .....</b>	<b>22</b>
2.8.1	Chromatografia .....	22
<b>3</b>	<b>Ciele práce .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Experimentálna časť .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Používané druhy mikroorganizmov .....</b>	<b>24</b>
4.1.1	Kvasinky .....	24
4.1.2	Riasy .....	24
<b>4.2</b>	<b>Zoznam použitých chemikálií .....</b>	<b>24</b>
4.2.1	Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek .....	24
4.2.2	Chemikálie použité na kultiváciu rias .....	24
4.2.3	Chemikálie použité na extrakciu .....	25
4.2.4	Chemikálie použité na HPLC .....	25
<b>4.3</b>	<b>Prístroje a pomôcky .....</b>	<b>25</b>
4.3.1	Prístroje a pomôcky pre kultiváciu buniek .....	25
4.3.2	Prístroje a pomôcky pre izoláciu a analýzu vybraných látok .....	25

<b>4.4</b>	<b>Kultivácia mikroorganizmov .....</b>	<b>26</b>
4.4.1	Kultivácia kvasiniek .....	26
4.4.2	Kultivácia rias .....	29
<b>4.5</b>	<b>Spracovanie biomasy .....</b>	<b>32</b>
4.5.1	Biomasa kvasiniek .....	32
4.5.2	Biomasa mikrorias .....	32
<b>4.6</b>	<b>Extrakcie a HPLC analýza.....</b>	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>GC analýza .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskusia .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1</b>	<b>Stanovenie nárastu biomasy kvasiniek .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2</b>	<b>Stanovenie produkcie aktívnych látok kvasinkami metódou HPLC .....</b>	<b>34</b>
5.2.1	Druh <i>Cystofilobasidium infirmominatum</i> .....	34
5.2.2	Druh <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> .....	36
5.2.3	Druh <i>Sporidiobolus metaroseus</i> .....	38
5.2.4	Druh <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	40
<b>5.3</b>	<b>Stanovenie produkcie lipidov kvasinkami metódou GC .....</b>	<b>43</b>
5.3.1	Druh <i>Cystofilobasidium infirmominatum</i> .....	43
5.3.2	Druh <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> .....	45
5.3.3	Druh <i>Sporidiobolus metaroseus</i> .....	45
5.3.4	Druh <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	45
<b>5.4</b>	<b>Stanovenie nárastu biomasy mikrorias.....</b>	<b>49</b>
<b>5.5</b>	<b>Stanovenie produkcie aktívnych látok mikroriasami metódou HPLC .....</b>	<b>49</b>
5.5.1	Druh <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	49
5.5.2	Druh <i>Chlorella vulgaris</i> .....	49
5.5.3	Druh <i>Desmodesmus dimorphus</i> .....	51
5.5.4	Druh <i>Desmodesmus obliquus</i> .....	51
5.5.5	Rod <i>Coccomyxa</i> .....	51
<b>5.6</b>	<b>Stanovenie produkcie lipidov mikroriasami metódou GC.....</b>	<b>53</b>
5.6.1	Druh <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	53
5.6.2	Druh <i>Chlorella vulgaris</i> .....	53
5.6.3	Druh <i>Desmodesmus dimorphus</i> .....	53
5.6.4	Druh <i>Desmodesmus obliquus</i> .....	56
5.6.5	Rod <i>Coccomyxa</i> .....	56
<b>5.7</b>	<b>Zhodnotenie vplyvu nutričných stresov na rast a produkciu látok.....</b>	<b>59</b>
5.7.1	Kvasinky .....	59
5.7.2	Mikroriasy .....	60
<b>6</b>	<b>Záver .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatúra.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Zoznam použitých skratiek.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Prílohy.....</b>	<b>66</b>

# 1 ÚVOD

V dnešnej dobe, kedy sa do popredia dostáva zdravý životný štýl a bioprodukcia, je využitie mikrobiologickej produkcie rôznych aktívnych látok veľmi žiadanou a riešenou témou. Karotenoidy, ktoré sú už teraz získavané kultiváciou kvasiniek, sú významné antioxidanty vyskytujúce sa v rastlinách a mikroorganizmoch, majú prospešný účinok na zrak, pleť a môžu byť vďaka antioxidantným vlastnostiam považované za prevenciu rakovinových ochorení. Ďalšie využitie majú v potravinárskom priemysle ako pigmenty. Karotenogénne mikroorganizmy okrem pigmentov produkujú významné látky, ako sú ergosterol a koenzým Q. Ergosterol (v prípade rias fytosterol) je provitamín vitamínu D, ktorý reguluje vstrebávanie vápnika a jeho ukladanie do kostí. Vitamín D je síce syntetizovaný pôsobením UV žiarenia v koži, aj v našej zemepisnej šírke je častý prípad jeho nedostatku na konci zimného obdobia. Koenzým Q sa vyznačuje veľkým uplatnením v kozmetike vďaka jeho podpore mitochondrií bazálnych buniek. Mikroorganizmy ďalej produkujú významné množstvo lipidov a esenciálnych mastných kyselín, čo by mohlo byť využité najmä ako lacný a ekologický spôsob obohacovania kŕmnych zmesí.

Kvôli uplatneniu mikrobiologickej produkcie v priemysle, je cieľom výskumu optimalizovať podmienky, aby bol využívaný proces a substrát čo najlacnejší a ekologický. Preto sa do popredia dostávajú odpadné substráty, obsahujúce mnohé látky, ktoré sa kultiváciou využijú a zhodnotia.

V tejto práci sa vybrané kmene kvasiniek a mikrorias kultivujú na rôznych zdrojoch dusíka s použitím soľného stresu, je optimalizovaný pomer dusíka ku uhlíku a sú aplikované odpadné substráty srvátka a perie.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Karotenoidy

Karotenoidy sú žlté, oranžové a červené pigmenty široko zastúpené vo všetkých typoch živých organizmov. U vyšších rastlín sú spolu s chlorofylmi v chloroplastoch, predovšetkým v listoch, plodoch a kvetoch a spôsobujú tak sfarbenie. Ďalej sa vyskytujú v cyanobaktériách, riasach, fototrofných baktériách a nefotosyntetizujúcich kvasinkách či plesniach. Živočíchy nemajú schopnosť si ich syntetizovať, iba ich môžu transformovať alebo ukladať v tukových tkanivách [1].

Medzi najhojnejšie kvasinkami produkované karotenoidy patrí  $\beta$ -karotén, torulén a torularhodín.

#### 2.1.1 Chemická štruktúra a vlastnosti

Karotenoidy sú uhľovodíky vytvorené zo štyroch izoprenoidných jednotiek – tetraterpény, alebo kyslíkaté deriváty týchto uhľovodíkov.

Vo svojej štruktúre obsahujú reťazec 40 uhlíkových atómov. Na oboch koncoch reťazca môže byť pripojená jednotka, ktorá je buď cyklická alebo acyklická a podľa toho delíme karotenoidy na acyklické (lykopén, fytoén, neurosporén), monocyklické ( $\gamma$ -karotén, torularhodín) a dicyklické ( $\beta$ -karotén,  $\alpha$ -karotén).

Karotenoidy sa ďalej delia podľa obsahu kyslíka. Čisté uhľovodíky nazývame karotény a sú to napr. lycopén, fytoén a karotén. Kyslíkaté deriváty karoténov nazývame xantofyly. Obsahujúce hydroxylovú, aldehydovú, karboxylovú alebo keto- skupinu.

Sfarbenie spôsobuje systém dvojitych konjugovaných väzieb s konfiguráciou *trans*. Konjugovaný reťazec umožňuje karotenoidom absorbovať vo viditeľnej oblasti spektra a vďaka tomu sa javí farebne [2].

Karotenoidy sú lipofilné farbivá, rozpustné iba v nepolárnych rozpúšťadlách.

#### 2.1.2 Funkcie v organizmoch

V organizmoch, ktoré nie sú schopné fotosyntézy, ako je to napr. u človeka, majú karotenoidy mnoho fyziologických funkcií.

Sú efektívnym likvidátorom voľných radikálov a podporujú imunitný systém. Sú to tiež významné antioxidanty, nakoľko obsahujú veľké množstvo dvojitych väzieb, ktoré sa ľahko oxidujú [3].

Karotenoidy sú dôležité pre prenos energie pri fotosyntéze a tiež ako doplnkové fotoaktívne pigmenty. Tento fakt súvisí s ich veľkou citlivosťou ku oxidácií no naopak sú pomerne odolné voči pôsobeniu oxidačných činidiel či zmene pH [3].

Niektoré karotenoidy sú provitamínom A, majú teda pozitívny vplyv na videnie a celý imunitný systém. Retinol je dietetický vitamín, tzn. že ho živočíchy musia prijímať z potravy vo forme rôznych prekursorov ako sú karotenoidy (rastlinný pôvod) alebo retinylestery (živočíšny pôvod). Taktiež sa využívajú k liečbe rakoviny, rôznych kardiovaskulárnych ochorení a aterosklerózy [2].

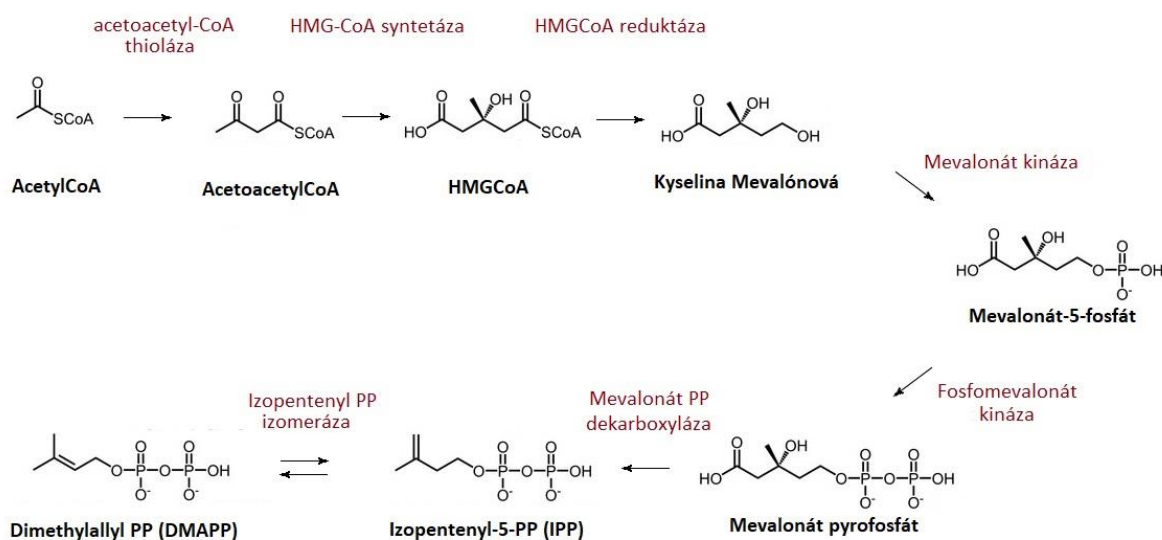
Najdôležitejším provitamínom A je  $\beta$ -karotén. Ďalšími účinnými provitamínmi A sú z karotenoidov  $\alpha$ -karotén a  $\beta$ -kryptoxantín. Cis-izoméry sú menej aktívne než all-trans izoméry vyskytujúce sa v prírode. Biologická aktivita závisí na prítomnosti nehydroxylovaného  $\beta$ -

jononového kruhu v štruktúre provitamínu A, alifatický reťazec ako lykopén má nulovú hodnotu biologickej aktivity provitamínu A [2].

### 2.1.3 Biosyntéza karotenoidov

Karotenoidy sú zaradené do skupiny izoprenoidov, preto ich syntéza vychádza zo všeobecnej metabolickej dráhy izoprenoidov, uskutočňovanej v cytosóle. Východnou látkou biosyntézy je acetyl-CoA, ktorý kondenzuje s medziproduktom syntézy mastných kyselín acetoacetyl-CoA za tvorby  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), ktorého redukciou vzniká kyselina mevalonová [4].

Kyselina mevalonová je postupne fosforylovaná a dekarboxylovaná, kedy vzniká izopentenylpyrofosfát (tj. aktívny izoprén), ktorý sa za enzymovej katalýzy prešmykne na dimethylallylpyrofosfát (Obrázok 1). Kondenzáciou jednotiek IPP a DMAPP vzniká geranyldifosfát – prekursor monoterpénov ( $C_{10}$ ), ktorého reťazec sa pripojovaním ďalších geranylových jednotiek predlžuje až do vzniku prvých bezfarebných prekursorov karotenoidov fytoénu a fytofluénu. Fytoén podlieha rade desaturačných a cyklizačných reakcií, pri ktorých vznikajú cyklické a acyklické farebné karotény a xantofyly. Východným necyklickým karoténom pre tvorbu ďalších derivátov je lykopén [5].



Obrázok 1 Metabolická dráha syntézy izoprenoidov [4]

### 2.1.4 Biotechnologická produkcia karotenoidov

Karotenoidy sa uplatňujú v potravinárstve, krmivárstve, farmaceutickom a kozmetickom priemysle ako pigmenty a tiež ako antioxidačne aktívne látky s pozitívnymi zdravotnými účinkami. Aj keď najčastejšími priemyslovo využívanými prirodzenými producentmi karotenoidov sú rastliny, v poslednej dobe sa výskum zameriava predovšetkým na produkciu pomocou mikroorganizmov, ktoré sú schopné tvoriť karotenoidné pigmenty, napr. fotosyntetické a nefotosyntetické baktérie, riasy, plesne a karotenogénne kvasinky. Mikrobiálna produkcia má veľkú výhodu v použití prírodných, lacných substrátov ako zdrojov uhlíku a energie [6].

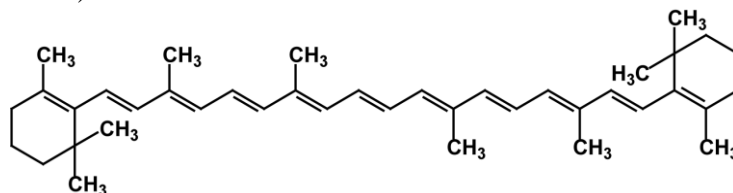
Najdôležitejšími kvasinkovými producentmi - tzv. karotenogénnymi kmeňmi sú rody *Rhodotorula*, *Rhodospirium*, *Sporobolomyces*, *Cystofilobasidium*, *Sporidiobolus* a

*Xanthophyllomonas*. Hlavné pigmenty, ktoré tieto kvasinky produkujú sú  $\beta$ -karotén,  $\gamma$ -karotén, torulén a torularhodín [7].

Okrem bioprodukcie sa karotenoidov dajú vyrábať aj synteticky, napríklad etylester kyseliny  $\beta$ -apo-8'-karotenovej označovaný ako „Carophyll Yellow“, kanthaxanthin (b,b'-karoten-3,3'-dion) označovaný ako „Carophyll Red“ a astaxanthin označovaný ako „Carophyll Pink“ [1].

### 2.1.5 $\beta$ -karotén

$\beta$ -karotén je terpén tvorený ôsmimi izoprenoidnými jednotkami, ktoré sú na každom konci cyklizované (Obrázok 2).



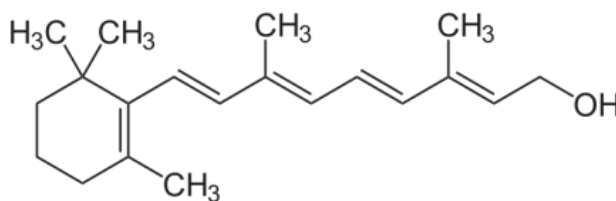
Obrázok 2 Štruktúra  $\beta$ -karoténu [7]

$\beta$ -karotén svetlo najviac absorbuje v rozmedzí 400-500 nm. Je to zeleno-modrá časť spektra.  $\beta$ -karotén sa javí ako oranžový, pretože sa červená a žltá farba odráža späť [8].

Karotény sa vyskytujú v dvoch základných formách pomenovaných písmenami gréckej abecedy,  $\alpha$ -karotén a  $\beta$ -karotén, ktoré sa líšia v pozícii dvojitej väzby nachádzajúcej sa na konci cyklickej skupiny (sú to izoméry). Existujú aj ďalšie karotény pomenované podľa ďalších písmen gréckej abecedy.  $\beta$ -karotén je najbežnejšou formou [9].

#### 2.1.5.1 Vitamín A

$\beta$ -karotén je prekursorom vitamínu A. V tele sa premieňa na retinol (vitamín A), ktorý je nevyhnutný pre správnu funkciu zraku. U  $\beta$ -karoténu nehrozí predávkovanie, pretože telo si z neho vytvorí len potrebné množstvo vitamínu A. Napriek tomu ľudia, ktorí prijímajú nadmerné množstvo  $\beta$ -karoténu, často trpia vedľajšími účinkami, ktoré sa prejavujú žltými škvrnami na koži (karotenodermia), spôsobenými ukladaním karotenoidov do najvrchnejších vrstiev epidermis [9].



Obrázok 3 Štruktúra vitamínu A [1]

Konverzia provitamínu A na vitamín A je štiepenie, ktoré môže prebiehať centricky alebo excentricky. Pri centrickom štiepení dochádza ku štiepeniu na dvojitej väzbe 15,15' za vzniku dvoch molov retinaldehydu na jeden mol  $\beta$ -karoténu. Pri excentrickom štiepení dochádza ku vzniku jedného molu retinalu na dva moly  $\beta$ -karoténu [10].

V črevnej sliznici je redukovaný retinaldehyd reduktázou a NADPH na retinol, ktorý je esterifikovaný. Estery retinolu sú z čрева transportované v podobe chylomikrónov cez krvný obeh do pečene. V pečeni je vitamín A ukladaný do zásoby ako ester v lipocytoch pravdepodobne ako lipoglykoproteínový komplex. Retinol môže byť prenesený z pečene vo

forme konjugátu s bielkovinou retinol-binding-protein (RBP). Kyselina retinová je transportovaná plazmou naviazaná na albumín. Toxicita vitamínu A sa prejaví po vyčerpaní kapacity väzbových bielkovín, bunky sú vystavené pôsobeniu nenaviazaného retinolu [5].

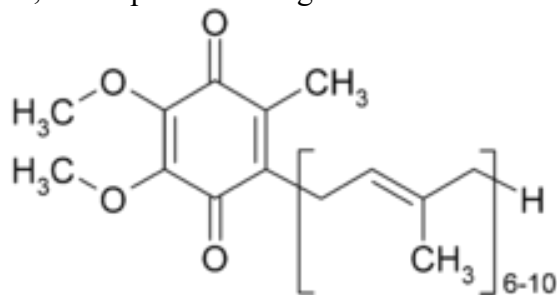
## 2.2 Ubichinón

Ubichinón (ubichinol, koenzým Q) je v skupine benzochinónov líšiacich sa dĺžkou izoprenoidného reťazca. Na určenie počtu izoprenoidných jednotiek v lipidovom reťazci je do názvu zahrnuté číslo (napr. CoQ<sub>10</sub> označujúce 10 izoprenoidných jednotiek) (Obrázok 4). Najrozšírenejšia dĺžka reťazca CoQ je špecifická pre rôzne organizmy: ľudia produkujú prevažne CoQ<sub>10</sub>, myši CoQ<sub>9</sub>, *E. coli* CoQ<sub>8</sub> a *S. cerevisiae* CoQ<sub>6</sub>. Pôvod názvu je v slove *ubikvitárny* – všadeprítomný [11].

CoQ v bunkách slúži ako prenášač elektrónov na komplexe I dýchacieho reťazca v mitochondriách. Mechanizmus účinku ubichinónu je založený na akceptovaní elektrónu a protónu vedúceho k redukcii na ubichinol. Ten je potom na v komplexe III dýchacieho reťazca reoxidovaný späť na ubichinón. Okrem tejto funkcie sa nachádza v každej bunkovej membráne, kde regeneruje tokoferol pri radikálovom strese [2][12].

Ubichinón nie je považovaný za vitamín, keďže nie je esenciálna látka. Prekurzorom biosyntézy je acetyl-CoA konvertovaný na mevalonát. Ten vstupuje do mevalonátovej dráhy, ktorá produkuje látku dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP), ktorá vstupuje do ďalších reakcií za vzniku sterolových a izoprenoidných biomolekúl, ako sú cholesterol, ubichinón, hem či vitamín K. Ubichinón prijímaný zo stravy je vstrebateľný len v malej miere [13].

Koenzým Q je priemyselne využívaný najmä v kozmetike, ako regeneračná látka na podporu delenia bazálnych buniek pokožky. Procesy starnutia sú spojené s poklesom koenzýmu Q v mitochondriách. Pri jeho nedostatku dochádza k uvoľňovaniu radikálov, ktoré spôsobia mutáciu DNA mitochondrií, a tak spomalia energetickú činnosť bunky [14].



Obrázok 4 Koenzým Q<sub>10</sub> [12]

## 2.3 Ergosterol

Ergosterol je provitamín vitamínu D<sub>2</sub>. Chemicky je to sterol a vyskytuje sa v hubách ako ich dominantný sterol, v zmesi s lipidmi, v ktorých je rozpustný, patrí do ich nezmydeliteľnej súčasti. Spolu s fosfolipidmi tvorí bunkové membrány v bunkách húb a kvasiniek. V čistom stave je to biela kryštalická látka. Ožiarení UV svetlom sa mení na ergokalciferol – vitamín D<sub>2</sub> [15][12].

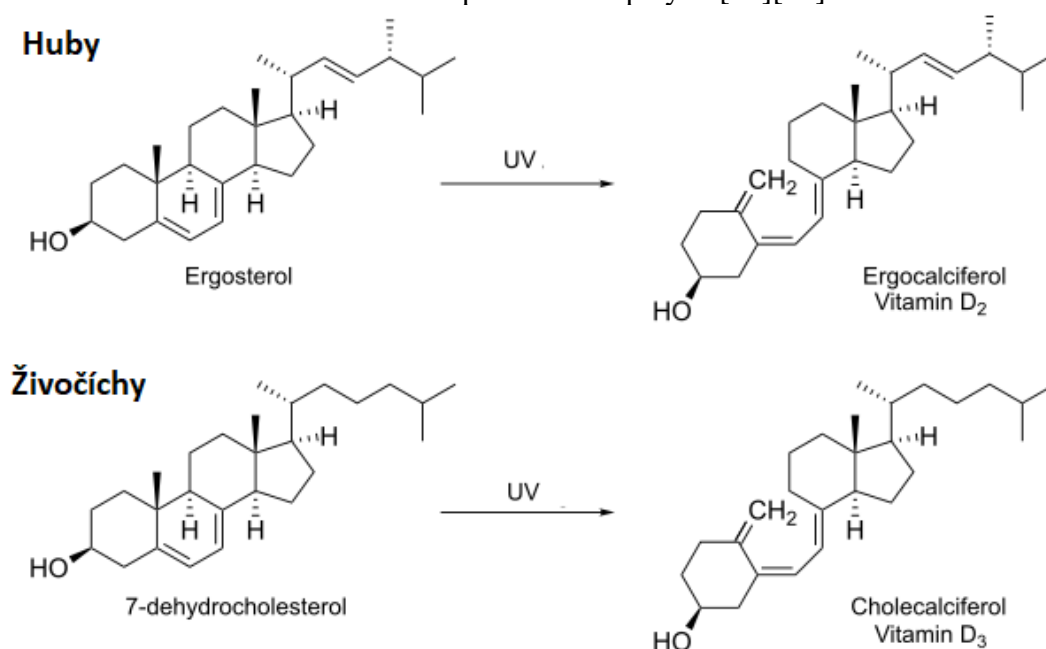
### 2.3.1 Ergokalciferol

Vitamín D<sub>2</sub>, je alternatíva húb a kvasiniek ku cholekalciferolu – vitamínu D<sub>3</sub>. Živočíšna forma je však vo funkcii vitamínu D viacnásobne účinnejšia, pretože ožarovaním ergosterolu môžu vznikať aj iné medziprodukty, ako napríklad lumisterol [13][7].

Vitamín D živočíchy teda môžu získavať zo stravy (huby, kvasené potraviny, živočíšne produkty) alebo si ho vo forme cholekalciferolu syntetizovať v koži po ožiarení cholesterolu UV zložkou svetla, takže je často považovaný za hormón. Premena provitamínov na vitamín D a ich štruktúry sú znázornené na obrázku Obrázok 5 [16].

Funkcia vitamínu D je aktivovať proteínu zachytávajúce vápenaté a fosforečné ióny zo stravy, ich transport do krvného obehu a reguláciu úschovy, respektíve spotrebovania zásob týchto minerálov v kostiach. Dostatočná hladina vitamínu D pôsobí ako prevencia pred rakovinou prsnej žľazy, konečníka a prostaty [17].

Nedostatok Vitamínu D spôsobuje nedostatočné vstrebávanie vápniku a fosforu zo stravy a tým môže viesť ku krivici u detí a osteoporóze u dospelých [15][16]



Obrázok 5 Syntéza dvoch typov vitamínov D z provitamínov [15]

### 2.4 Pyrrolové rastlinné farbivá

Najrozšírenejšie pyrrolové farbivo je chlorofyl. Je to substituovaný tetrapyrrol (porfyrín) s koordinačne viazaným iónom horčíku, ktorého štruktúra je podobná hemu.

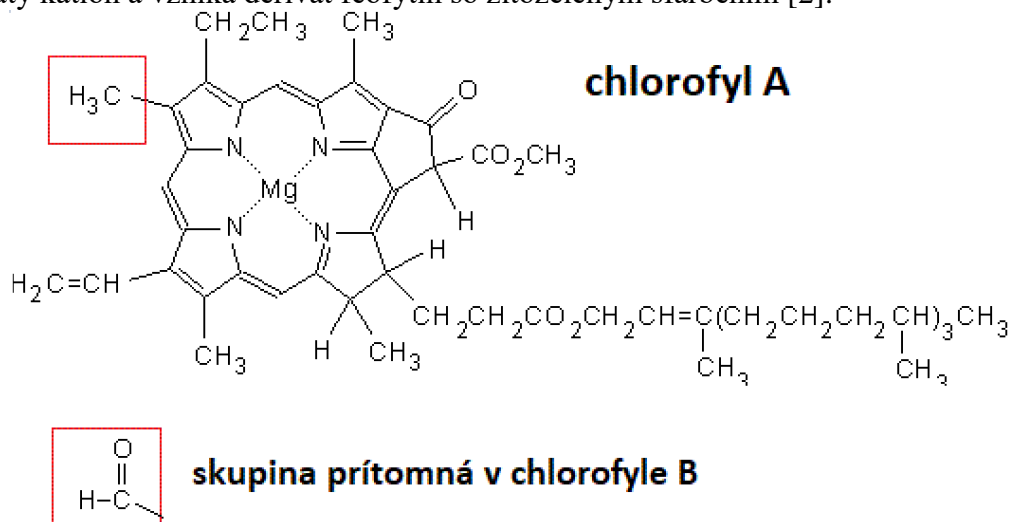
Jeho syntéza vychádza z aminolevulovej kyseliny (ALA), produkovanej z glutamátu. Dve molekuly ALA kondenzujú za vzniku porfobilinogénu (PBG), ktorého štyri molekuly kondenzujú a vzniká protoporfyrín IX, spoločný prekursor hemu aj chlorofylu. Enzým magnézium-chelatáza pripojí horečnatý kation do kruhu a nasledujú ďalšie modifikácie kruhu, pripájanie postranných reťazcov, v ktorých sa líšia chlorofyl A a B. Chlorofyl B má namiesto metylovej skupiny formylovú, ako je ukázané na obrázku Obrázok 6 [18].

Nachádza sa v chloroplastoch rastlinných buniek v dvoch formách chromoproteínov – A a B, ktoré sa od seba líšia substituentom na jednom pyrrolovom cykle, čo spôsobuje posun

ich absorpčných spektier a možnosť samostatnej analýzy. Chlorofyl A je modrozelený a chlorofyl B žltozelený [2].

Chlorofyl tvorí fotoreceptory na chloroplastoch. Vďaka svojej konjugovanej polyénovej štruktúre má vysokú absorpciu žiarenia v oblasti 400 – 700 nm (viditeľné spektrum).

Chlorofyl je citlivý na zvýšené teploty v kyslom prostredí, kedy sa z molekuly odštiepuje horečnatý kation a vzniká derivát feofytín so žltozeleným sfarbením [2].



Obrázok 6 Štruktúra chlorofylu A a skupina, ktorá sa vyskytuje v chlorofyle B [18]

## 2.5 Komplexné lipidy

Lipidy sú estery vyšších mastných kyselín a alkoholov a ich deriváty. Prevažne nepolárnych štruktúr dáva lipidom ich olejovú až voskovú povahu a nerozpustnosť vo vode. Lipidy sa delia na jednoduché a zložené. Jednoduché lipidy sú acylglyceroly a vosky, zložené sú fosfolipidy, sfingolipidy a komplexné zlúčeniny ako lipoproteíny či glykolipidy. Najväčšiu časť lipidov tvoria triacylglyceroly a polárne lipidy obsahujúce zvyšok kyseliny fosforečnej – fosfolipidy [2].

### 2.5.1 Funkcia lipidov v organizmoch

Fosfolipidy v bunkách tvoria biomembránu svojou spontánnou orientáciou do dvojvrstiev, vďaka ktorej je možné fungovanie bunky vo vodnom prostredí a zabezpečujú prenos podnetov. Triacylglyceroly majú funkciu zásoby a zdroja energie, sú energeticky najbohatšia potraviná. Živiny prijaté do organizmu nadbytočne sa premieňajú na acylglyceroly a ukladajú ako zásoba energie. V ľudskom tele tuky slúžia aj ako mechanická ochrana niektorých orgánov, napríklad obličiek, a vrstva tuku v koži ako tepelná izolácia. Vrstvy voskov na tele živočíchov a povrchu vyšších rastlín slúžia ako hydrofóbná bariéra zabráňujúca strate a nadmernému prijímaniu vody [2].

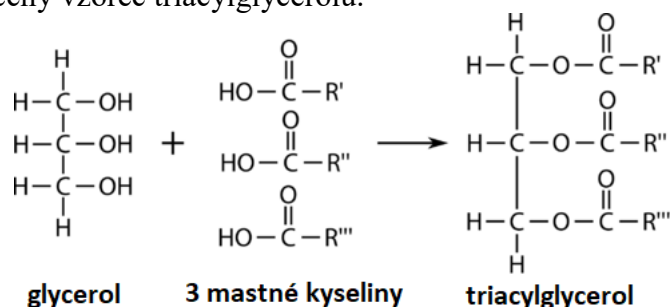
### 2.5.2 Mastné kyseliny

Základnou stavebnou jednotkou lipidov sú alifatické monokarboxylové kyseliny s reťazcom s 4 až 26 atómami uhlíku, inak nazývané aj mastné kyseliny. Poznáme viac ako 50 druhov mastných kyselín. V prírode sa vyskytujú mastné kyseliny s párnym počtom uhlíkov, s nasýtenými alebo nenasýtenými väzbami. Nasýtené majú tuhú konzistenciu, nenasýtené

olejovú. Nenasýtené kyseliny môžu obsahovať jednu alebo viac izolovaných dvojítých väzieb, zvyčajne v strednej časti reťazca [19].

### 2.5.3 Acylglyceroly

Acylglyceroly sú estery mastných kyselín a glycerolu. Vyskytujú sa mono-, di- a triacylglyceroly, podľa počtu esterovo viazaných karboxylových kyselín. Na obrázku Obrázok 7 je všeobecný vzorec triacylglycerolu.



Obrázok 7 Vzorec triacylglycerolu [2]

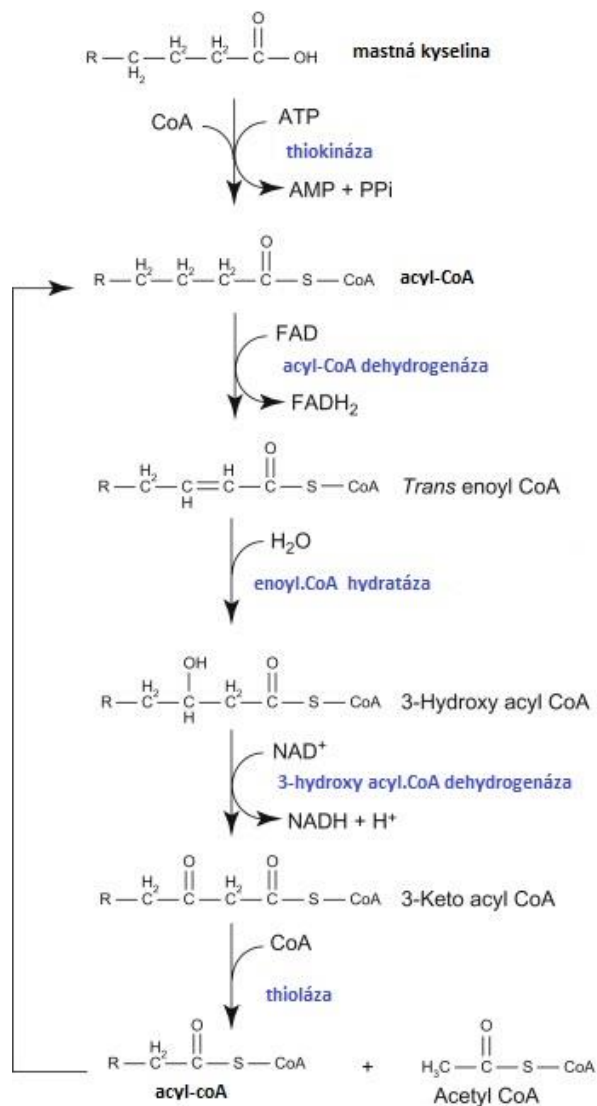
V praxi sa triacylglycerolom hovorí tuky alebo lipidy. Rozlišujú sa tuhé tuky, zvyčajne živočíšneho pôvodu, ktoré obsahujú dve a viac nasýtených mastných kyselín a kvapalné oleje prevažne rastlinného pôvodu obsahujúce aspoň dve nenasýtené mastné kyseliny. Príkladmi tuhých živočíšnych tukov sú bravčová masť, rastlinných olejov slnečnicový olej. Výnimkou pravidla o súvislosti konzistencie s pôvodom je napríklad kakaové maslo.

TAG tvoria až 90 % zásobného tuku organizmov, v ktorom sa okrem nich nachádzajú ešte fosfolipidy, karotenoidy, steroly, terpény a alifatické alkoholy. V organizmoch živočíchov sa lipidy nachádzajú v podkožnom tukovom tkanive a okolo dôležitých orgánov. V rastlinnom tele sú najviac zastúpené v semenách [2].

### 2.5.4 Odbúravanie lipidov

Prvým krokom odbúravania lipidov je hydrolytické štiepenie esterových väzieb katalyzované enzýmami lipázami. Vznikajú mastné kyseliny a glycerol. U cicavcov sa tvoria lipázy v pankrease a stene čreva, hydrolytické štiepenie prebieha v dvanástniku a tenkom čreve. Takto vzniknuté mastné kyseliny sa môžu použiť na syntézu nových triacylglycerolov alebo ďalej štiepiť.

Energeticky najvýhodnejšia cesta je  $\beta$ -oxidácia, ktorá prebieha v mitochondriách. Je to postupné cyklické skracovanie reťazca mastnej kyseliny o dva atómy uhlíka za vzniku acetyl-CoA. Reakcie v jednom cykle sú aktivácia mastnej kyseliny naviazaním koenzýmu A, dehydrogenácia za vzniku dvojitej väzby, hydratácia a následná dehydrogenácia za vzniku  $\beta$ -oxoacyl-CoA. K tomuto medziproduktu pristupuje opäť molekula CoA a odštiepi sa acetyl-CoA, ktorý vstupuje do citrátového cyklu. Podrobnejší sled reakcií a doprovoďných enzýmov je znázornený na obrázku Obrázok 8 [11].

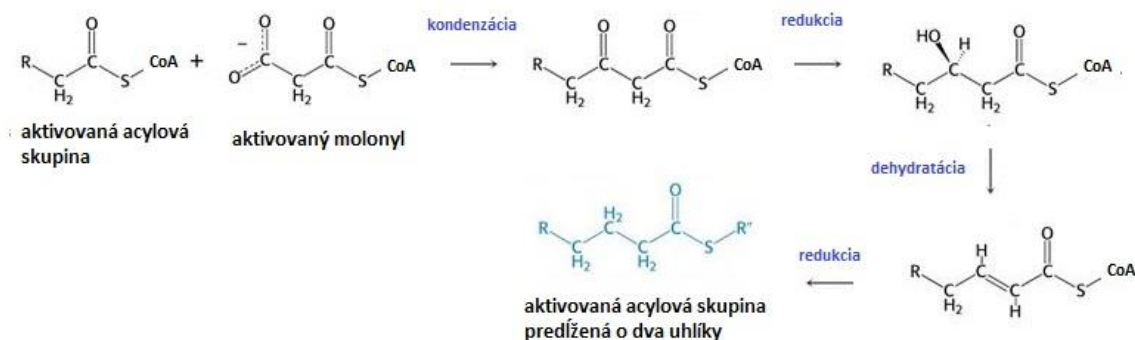


Obrázok 8  $\beta$ -oxidácia mastných kyselín [16]

## 2.5.5 Biosyntéza lipidov

Biosyntéza mastných kyselín je proces podobný obrátenej  $\beta$ -oxidácii. Prebieha v cytosóle a líši sa najmä katalytickými enzýmami. Vstupná látka je acetyl-CoA, ktorý sa karboxyluje na malonyl-CoA, čo je molekula, ktorá počas biosyntézy predlžuje reťazec. Prvým krokom je naviazanie malonyl-CoA na molekulu vznikajúceho acyl-CoA. Nastáva transacylácia a kondenzácia, čiže prenos a spojenie malonyl-CoA na acylovú skupinu a predĺženie reťazca o dva atómy uhlíka za vzniku 3-oxoacylu. Nasleduje redukcia, dehydratácia a druhá redukcia, za vzniku nasýteného acyl-CoA. Tento proces sa opakuje až do vzniku požadovanej dĺžky reťazca, čo je spravidla C<sub>16</sub> – palmitát. Schéma reakcie je znázornená na obrázku Obrázok 9. Ďalšie úpravy vedú ku vzniku dlhších reťazcov alebo dvojitéh väzieb pomocou stereošpecifických dehydrogenáz. Tieto zmeny nenastávajú v cytosóle [20].





Obrázok 9 Biosyntéza mastných kyselín [11]

## 2.5.6 Biosyntéza triacylglycerolov

Biosyntéza TAG prebieha hlavne v tukovom tkanive. Vstupné látky sú aktivovaná forma glycerolu – *sn*-glycerol-3-fosfát a tri acyl-CoA. *Sn*-glycerol-3-fosfát vzniká z glycerolu alebo redukciou dihydroxyacetonfosfátu (z metabolizmu sacharidov). Dva acyly mastných kyselín sa v prvom kroku prenású na aktivovaný glycerol a vznikne fosfatidát. V druhom kroku sa odštiepi fosfát za vzniku diacylglycerolu, na ktorý je prenásený tretí acyl mastnej kyseliny [21].

## 2.6 Karotenogénne mikroorganizmy

### 2.6.1 Karotenogénne kvasinky

Kvasinky sú zaradené do ríše *Fungi*. Sú eukaryotické jednobunkové mikroorganizmy, pričom niektoré druhy majú schopnosť vytvoriť reťazce spojených pučiach buniek známych ako pseudohýfy. Veľkosti kvasiniek sa značne líšia v závislosti od druhu a prostredia, typicky s priemerom 3–4  $\mu\text{m}$ . Väčšina kvasiniek sa reprodukuje vegetatívne mitózou, často procesom asymetrického delenia – pučaním [22][23].

Niektoré druhy kvasiniek sú schopné produkovať vo vode nerozpustné červené farbivá karotenoidnej povahy. Produkciou týchto farbív sa kvasinky chránia proti účinkom ultrafialovej zložky slnečného svetla. Mikrobiálna produkcia karotenoidov má oproti rastlinnej veľkú výhodu v použití prírodných, lacných substrátov ako zdrojov uhlíku a energie. Akumuláciou karotenoidov sa vyznačujú červené kvasinky patriace do triedy *Basidiomycetes* [24].

Medzi najčastejšie kvasinkami produkované farbivá patrí  $\beta$ -karotén a torulén, percentuálne zastúpenie jednotlivých typov karotenoidov závisí od druhu kvasinky a podmienkach kultivácie. Podmienkou ich tvorby je prístup kyslíka a svetla. Vďaka produkcii týchto pigmentov majú kvasinky typické červené alebo žlté až oranžové sfarbenie, z tohto dôvodu bývajú tiež často nazývané ako kvasinky červené [6].

#### 2.6.1.1 Rod *Cystofilobasidium*

Tento rod bol skôr charakterizovaný ako rod *Rhodospiridium*. Dnes sú už poznané tri karotenogénne kmene – *C. biosporidii*, *C. capitatum* a *C. infirmominiatum*. Rod tvorí hladké kolónie, tvar buniek je guľatý až oválny. Kolónie sú vďaka obsahu karotenoidov sfarbené oranžovo až škoricovo.

Tento druh je striktne aeróbny, nie je schopný skvasovať glukózu. Rozmnožuje sa pučaním alebo pohlavne tvorením basidoimyciet, je schopný tvoriť endospóry. Ideálna teplota na kultiváciu je 18-25°C [11].



Obrázok 10 Kolónia *Cystofilobasidium infirmominiatum* [25]

Rod *Rhodotorula* patrí do čeľade *Basidiomycota* a obsahuje 62 druhov. Má guľaté alebo oválne bunky. Vegetatívne sa rozmnožujú pučaním, môžu tvoriť mycéliá alebo pseudomyceliá, endospóry ani iné druhy spór nevytvárajú. Kolónie sú rôznych farieb od žltej cez oranžovú do červenofialovú, v závislosti na zložení živnej pôdy [7][22].

*Rhodotula* sa vyskytuje veľmi hojne v prírode na rôznych substrátoch, vo vzduchu, vo vodách, ale môže taktiež spôsobiť i ochorenia u ľudí a zvierat, napríklad infekciu oka – keratitídu alebo kožné infekcie u kurčiat, najčastejšie spôsobené druhom *R. mucilaginosa* [23][25].

Druhy rodu *Rhodotorula* sú často vyhľadávané na rozličné výskumy, pretože sú ubikvitné organizmy, čiže rozšírené vo všetkých prostrediach. Možno ich izolovať zo vzduchu, z pôdy, zo sladkej i slanej vody, z vinárskych prevádzok, z povrchu rastlín aj z rôznych orgánov živočíšneho tela [27].

Rod nemá kvasné schopnosti, ale prežíva za rôznorodých podmienok. Minimálna teplota rastu je 0,5-5°C a minimálne pH okolo 2,5, čo jej dáva možnosť kaziť potraviny [28]. Je významne lipogénny a v potravinárskom priemysle sa využíva na produkciu obohatenej biomasy ako krmiva pre dobytok, vzhľadom na významný obsah karotenoidov [7].



Obrázok 11 Kolónia rodu *Rhodotorula* [29]

#### 2.6.1.2 Rod *Sporobolomyces*

Tento rod je neistého taxonomického umiestnenia, jeho telomorfné formy sú zahrnuté do rodu *Sporidiobolus*. Tvorí blastokonídie, žije v rôznych usporiadaniach ako hýfy, pseudohýfy alebo jednotlivé bunky. Bunky sú elipsovitého tvaru. Nemá kvasné schopnosti. Kolónie sú hladké, lesklé až matné, ukážka na obrázku Obrázok 12 [14].



Obrázok 12 Kolónia *Sporobolomyces salmonicolor* [25]

#### 2.6.2 Mikroriasy

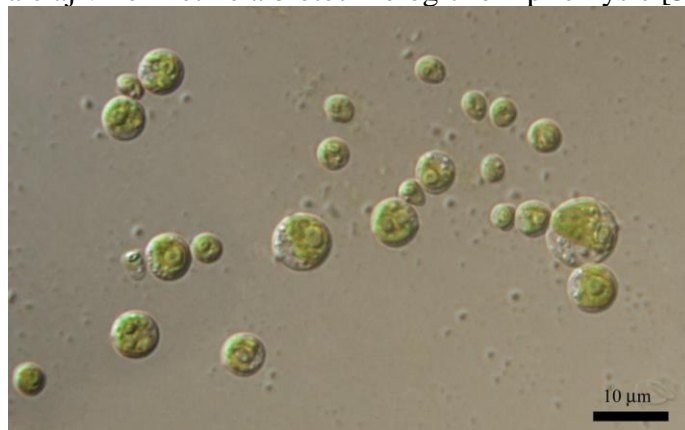
Riasy sú organizmy schopné fotosyntézy žijúce vo vodnom prostredí. Niekedy sa do skupiny rias priradzujú aj sinice, nazývané aj modrozelené riasy. Riasy sú najjednoduchšie rastliny, ich stielka nie je rozlíšená a preto sa zaraďujú do skupiny nižšie rastliny. Môžu byť jednobunkové aj mnohobunkové a dosahovať veľké rozmery, väčšina druhov má však mikroskopické rozmery, niektoré tvoria kolónie [28].

Riasy sú fotoautotrofné organizmy, vyžadujú prítomnosť najlacnejšieho zdroja uhlíku – oxidu uhličitého. Ako zdroje dusíka sa využívajú dusitany, dusičnany, amoniak alebo močovina, z toho amoniak je najvhodnejší, lebo sa už nachádza v redukovanom stave. Zdroje ostatných prvkov, ako fosforu, sú vhodné anorganické. Nároky na výživu sú teda u rias relatívne nízke, a preto je v súčasnosti ich produkcia vyhľadávaná. Na zachytávanie fotónov energie zo svetla obsahujú fotosyntetické farbivá. Vytvárajú organickú hmotu a kyslík, z pohľadu ekológie sú to primárny producenti. Vyskytujú sa vo všetkých vodných ekosystémoch [28].

Riasy sú zdrojom potravy už dlhý čas, tradične v prímorských oblastiach. Obsahujú významné množstvo bielkovín, lipidov a vitamínov. Okrem toho môžu byť využité ako prostriedok na izoláciu oxidu uhličitého z emisií, na čistenie odpadových vôd od kovov, dusičitanov, fosforečnanov a organických látok, či výrobu biopalív [29].

#### **2.6.2.1 Rod *Chlorella***

*Chlorella* patrí do pododdelenia *Chlorophyta*. Je to jednobunková riasa s guľatými bunkami (Obrázok 13). Rozmnožovanie prebieha delením. *Chlorella* sa vyskytuje v sladkých aj slaných vodách. Je známa kvôli vysokému obsahu bielkovín, minerálov a vitamínov, preto je používaná ako doplnok stravy, ale aj v kozmetike a biotechnologickom priemysle [31][33].



Obrázok 13 *Chlorella sorokiniana* [32]

#### **2.6.2.2 Rod *Desmodesmus***

Tento kmeň riasy je často rozšírený v sladkých vodách. Tvorí podskupinu skupiny *Scenedesmus*. *Desmodesmus* má zaoblené bunky usporiadané v cenóbiách uložených lineárne alebo v radoch (Obrázok 14). Bunková stena obsahuje často trňovité výbežky. Rozmnožuje sa najčastejšie nepohlavne tvorbou autospór. Sú ľahko rastúce a tolerujú širokú škálu podmienok, vďaka čomu boli jednými z prvých rias používaných na výskumné účely [31][34].

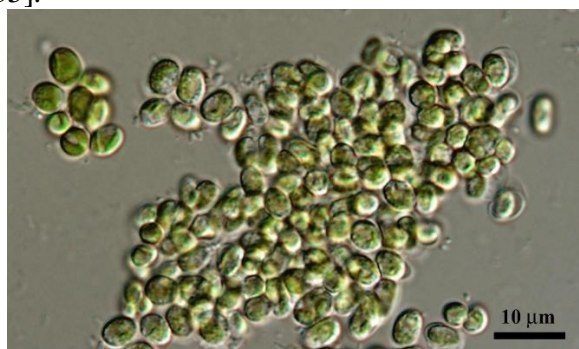




Obrázok 14 *Desmodesmus dimorphus* [32]

### 2.6.2.3 Rod *Coccomyxa*

Je to zelená riasa z triedy *Trebouxiophyceae*. Do rodu patrí 23 platných druhov. Bunky sú malé (do 14 μm) najčastejšie elipsovitého tvaru samostatné alebo usporiadané do slizu (Obrázok 15). Rozmnožovanie je výlučne pomocou tvorby autospór. Zaradenie tohto rodu do taxonómie bolo náročné kvôli malým bunkám a tvorbe slizu, čo znemožnilo pozorovania. Typovým druhom je *Coccomyxa confluens* [35].



Obrázok 15 *Coccomyxa* [32]

## 2.7 Odpadné substráty

### 2.7.1 Perie

Perie spolu s ostatnými odpadovými kožnými derivátmi, ako sú rohy, kopytá, chlpy a podobne, je nie veľmi využívaný a ročne sa takýchto odpadov vyhodí veľké množstvo. Z hľadiska obsahu využiteľných látok je perie zaujímavé hlavne kvôli keratínu – skleroproteínu, obsahujúcemu okrem fenylalanínu a tryptofánu všetky nepostrádateľné aminokyseliny. Vysoký obsah tvorí cysteín a tyrozín. Bez rozštiepenia na AMK nie je stráviteľný ani žalúdočnými šťavami. V niektorých krajinách sa perie využíva ako doplnok krmiva pre zvieratá, perie môže tiež nájsť využitie vo fermentačnom priemysle [36].

## 2.7.2 Srvátka

Srvátka je tekutina vznikajúca pri výrobe syrov a tvarohov. Je to zvyšok mlieka po fermentácii a zhlukovaní zrazených mliečnych proteínov. Obsahuje asi 95 % vody, sušina obsahuje 75 % laktózy, 13 % proteínu a 8 % minerálnych látok. Srvátkový proteín tvorí hlavne albumín a globulín a malú časť kazeín ako syrový prach, ktorý spôsobuje zakalenie srvátky a sediment. Obsah minerálov je podobný ako v mlieku, keďže skoro všetky nerastné živiny prechádzajú z mlieka do srvátky. Z toho dôvodu, že srvátka neobsahuje skoro žiadny tuk, nenachádzajú sa v nej ani vitamíny A,D,K, ale má významný obsah vitamínov z rady B [37][36].

Využíva sa ako krmivo, proteínový doplnok stravy prísada do pečiva a cukroviniek. V moderných biotechnológiách sa pristupuje k jej využitiu ako kultivačného média pre mikroorganizmy.

Jej priemyselné spracovanie zvyčajne vedie ku úprave na sušenú srvátku. Využíva sa na to vákuová odparka, reverzná osmóza, sprejové sušenie alebo ultrafiltrácia. Dosahuje sa 50 - 55% obsah sušiny [37][28].

## 2.8 Analytické metódy

### 2.8.1 Chromatografia

Chromatografické metódy sú separačné metódy, ktoré využívajú dve fyzikálne odlišné fázy. Jedna fáza je nepohyblivá – stacionárna, druhá pohyblivá – mobilná. Pohybom mobilnej fázy je vzorka unášaná a jej jednotlivé zložky rozdeľované na základe odlišnej rýchlosti pohybu, čo je spôsobené rôznymi fyzikálno - chemickými interakciami medzi zložkami vzorku a fázami. Uplatňujú sa aj intermolekulárne sily (hydrofilné, hydrofóbne, elektrostatické...) [38].

Podľa mechanizmu interakcie sa rozlišuje adsorpčná, rozdeľovacia, ionexová, gélová permeačná a afinitná chromatografia.

Typ	Rozdeľovacia vlastnosť zložiek
Adsorpčná rozdeľovacia	Schopnosť zložiek pútať sa na SF
Rozdeľovacia	Rozpustnosť zložiek v MF a SF
Ionexová	Príťažlivé sily pôsobiace na zložky od SF
Gélová permeačná	Veľkosť zložiek na pórovitej SF
Afinitná	Úzko selektívna afinita zložky ku SF

Chromatografia môže mať stacionárnu fázu usporiadanú v kolóne alebo planárne. Kolónová chromatografia obsahuje stacionárnu fázu v stĺpci, alebo na vnútornom povrchu trubice. Planárna chromatografia využíva vrstvu stacionárnej fázy nanesenú na sklenenú dosku, hliníkovú fóliu či tvorí gél.

Mobilná fáza je plyn pri plynovej chromatografii, kvapalina pri kvapalinovej chromatografii, alebo tekutina v nadkritickom stave pri chromatografii s nadkritickou mobilnou fázou.

Chromatografická separácia umožňuje oddelenie zložiek zmesi, ale aj ich identifikáciu a stanovenie pri porovnaní so štandardmi, čiže kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Detektor registruje chemické či fyzikálne vlastnosti látky a vytvára signál. Pri kolónovej chromatografii vzniká chromatogram, ako vyhodnotenie signálov z detektoru. Je to súbor chromatografických píkov gaussovského tvaru. Výška (resp. plocha) píku odpovedá množstvu oddelenej látky a šírka je ovplyvnená účinnosťou chromatografického systému [39].

### **3 CIELE PRÁCE**

Cieľom práce je sledovanie produkcie aktívnych látok vybranými druhmi kvasiniek a rias kultivovaných na rôznych zdrojoch uhlíka a dusíka.

V rámci práce sú riešené nasledujúce čiastkové úlohy:

- Literárna rešerš zameraná na využívanie rôznych nutričných zdrojov karotenogénnymi kvasinkami a autotrofnými riasami
- Kultivácia vybraných druhov kvasiniek a rias na rôznych kombináciách zdrojov C a N vrátane odpadných substrátov
- Stanovenie rastových a produkčných charakteristík študovaných kmeňov
- Porovnanie vplyvu typu nutričného zdroja na produkciu biomasy a vybraných metabolitov u študovaných kvasiniek a rias.

## **4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **4.1 Použité druhy mikroorganizmov**

#### **4.1.1 Kvasinky**

*Rhodotorula mucilaginosa* CCY 20-9-7

*Cystofilobasidium infirmominiatum* CCY 17-18-4

*Sporobolomyces salmonicolor* CCY 19-4-25

*Sporobolomyces metaroseus* CCY 19-6-20

#### **4.1.2 Riasy**

*Chlorella sorokiniana* CCALA 260

*Chlorella vulgaris* CCALA 924

*Desmodesmus dimorphus* CCALA 437

*Desmodesmus obliquus* CCALA 454

*Coccomyxa* sp. CCALA 912

### **4.2 Zoznam použitých chemikálií**

#### **4.2.1 Chemikálie použité na kultiváciu kvasiniek**

Kvasničný extrakt, Carl Roth (SRN)

Peptón kazeínový, Carl Roth (SRN)

Agar bakteriologický, VWR International (ČR)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s. r.o. (ČR)

Síran amónny p.a., Lachema (ČR)

Močovina, p.a., Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Srvátka, Mlékárna Olešnice, a.s.

Laktazym, Dr. Max

Perie hydínové

Hydroxid sodný, Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Síran horečnatý heptahydrát p.a., Chemapol (ČR)

Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)

#### **4.2.2 Chemikálie použité na kultiváciu rias**

Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Síran amónny p.a., Lachema (ČR)

Močovina, p.a., Penta (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Kyselina citrónová p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Na<sub>2</sub>-EDTA.2H<sub>2</sub>O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

(NH<sub>4</sub>)<sub>5</sub>Fe(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub> p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Uhličitan sodný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)

Hydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-ner, s.r.o. (ČR)



Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Kyselina boritá p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)  
Molybdénan sodný dihydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)  
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)  
Chlorid zinečnatý p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Chlorid draselný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

#### **4.2.3 Chemikálie použité na extrakciu**

HPLC: Acetón p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Etylacetát pre HPLC, VWR International  
GC: Metanol pro HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina sírová, Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Hexan pre HPLC, VWR International  
Hydroxid sodný, Lach-ner, S.r.o. (ČR)  
Hexadekanová kyselina, Sigma-Aldrich (SRN)

#### **4.2.4 Chemikálie použité na HPLC**

Metanol pre HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Acetonitril pre HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Etanol pre HPLC, Sigma-Aldrich (SRN)

### **4.3 Prístroje a pomôcky**

#### **4.3.1 Prístroje a pomôcky pre kultiváciu buniek**

Spektrofotometer VIS, Helios δ, Unicam (GB)  
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)  
Trepáčka Yellow line, (SRN)  
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)  
Analytické váhy Boeco (SRN)  
Box Aura mini BioTech (ČR)

#### **4.3.2 Prístroje a pomôcky pre izoláciu a analýzu vybraných látok**

Vortex Genie 2 - Scientific Industries (USA)  
Zostava HPLC/PDA: Pumpa - Finnigan SURVEYOR  
Autosampler  
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)  
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR  
Vyhodnocovací systém Xcalibur  
Kolóna Kinetex C18, 100Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm,  
Phenomenex Držák predkolóny - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)  
Predkolóna - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex  
Zostava GC/FID: Autoinjektor AI 1310 ThermoFisher Scientific (USA)

Plynový Chromatograf Trace 1300  
Kapilárna kolóna ZB-FAME o rozmeroch 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm  
Filtre striekačkové PTFE, 13 mm, porozita 0,45 µm, Chromservis (ČR)

## 4.4 Kultivácia mikroorganizmov

### 4.4.1 Kultivácia kvasiniek

Kultivácia kvasiniek prebiehala v 4 častiach: nárast kultúry na pevnej živnej pôde, inokulum I, inokulum II a kultivácia v produkčnom médiu. Prebiehala za podmienok laboratória, 23°C, normálny tlak. Kultivačné nádoby boli umiestnené pod stálym zdrojom svetla.

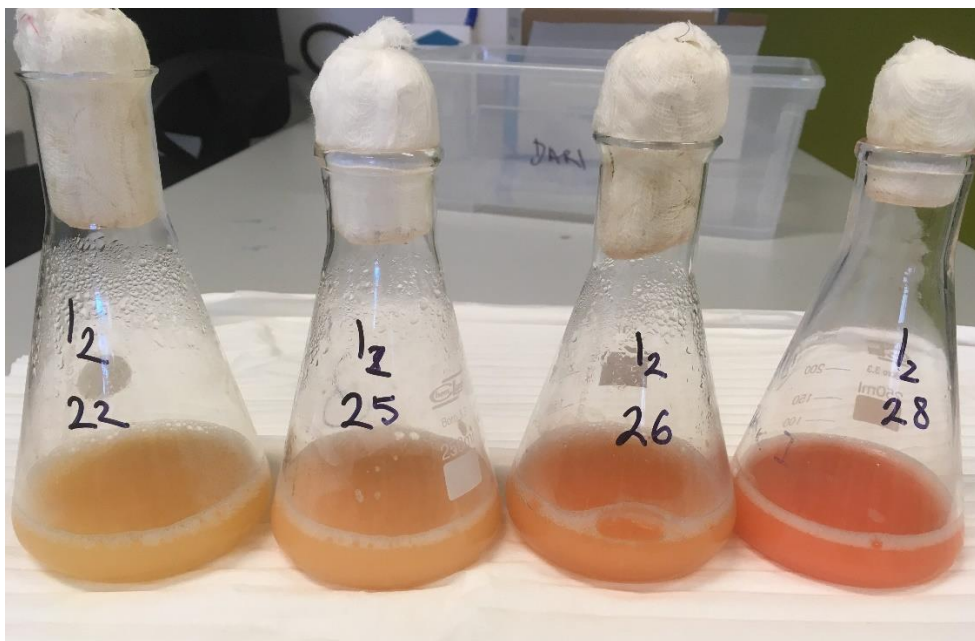
#### 4.4.1.1 Pevná pôda a inokulá I, II

Náter kultúry na Petriho misku bol zo zásoby kmeňa uchovávanom v hlboko mraziacom boxe za teploty -80°C, v roztoku glycerolu a YPD média v pomere 1:1. Zloženie živnej pôdy bolo komplexné médium YPD s prídavkom bakteriologického agaru 20 g na liter média. Miska bola umiestnená pod zdroj svetla a očkovanie narastenej kultúry bolo uskutočnené zväčša o 3-5 dní.

Inokulum I malo objem 20 ml, očkované bolo z agarovej misky dvoma odbermi inokulačnej kľúčky. Inokulum II bolo o objeme 65 ml, očkované 11 ml z inokula I, inokulačný pomer bol teda štandardne zachovaný 1:5. Dĺžka kultivácie oboch inokulí bola 24 hodín na trepačke pod neustálym zdrojom svetla. Na obrázku Obrázok 16 je ukážka štyroch vyrastených inokulí II na očkovanie produkčných médií. Zloženie inokulí bolo komplexné médium YPD, ktorého jednotlivé zložky sú znázornené v tabuľke Tabuľka 1

Tabuľka 1 Zloženie inokulí I a II

Zložka	Množstvo
Voda	1000 ml
Glukóza	20 g
Peptón	20 g
Kvasničný extrakt	10 g



Obrázok 16 Inokulá II štyroch druhov kvasiniek: 22 - *Cystofilobasidium infirmominiatum*, 25 - *Sporobolomyces salmonicolor*, 26 - *Sporobolomyces metaroseus*, 28 - *Rhodotorula mucilaginosa*

#### 4.4.1.2 Produkčné médiá

Kvasinky boli kultivované v Erlenmayerových bankách 100 ml v objeme 40 ml.

Produkčné médiá boli zaočkované 6 ml inokula II a ponechané na trepačke pod zdrojom svetla 4 dni. Ako zdroj dusíka boli používané močovina a síran amónny v kombinácii s obsahom chloridu sodného 0; 0,5; 1 a 2 mol/dm<sup>3</sup>. Ďalej bol sledovaný vplyv pomeru obsahu dusíka ku obsahu uhlíku na produkciu aktívnych látok a boli odskúšané pomery C/N 16, 25, 50 a 100. Zloženie jednotlivých produkčných médií je znázornené v tabuľke Tabuľka 2.

Tabuľka 2 Zloženie produkčných médií

Látky vo všetkých produkčných médiách	
Zložka	Množstvo
Voda	1000 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,7 g
Zdroj dusíka	
Zložka	Množstvo
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,0 g
Močovina	1,8 g
Zdroj uhlíka - glukóza	
Pomer C/N	Množstvo
16	30,0 g
25	45,45 g
50	90,9 g
100	181,8 g

NaCl	
Koncentrácia (mol/l)	Množstvo
0,0	0 g
0,5	29,2 g
1,0	58,4 g
2,0	116,9 g

Pre jednoduchšie značenie produkčných baniek boli používané číselné skratky. V produkčných médiách v rámci jedného C/N pomeru sa menil zdroj dusíka a obsah soli. V tabuľke Tabuľka 3 je ukážka značenia. Skratky pre jednotlivé druhy kvasiniek boli odvodené od čísla v zbierke kultúr:

22 - *Cystofilobasidium infirmominiatum*

25 - *Sporobolomyces salmonicolor*

26 - *Sporobolomyces metaroseus*

28 - *Rhodotorula mucilaginosa*

Tabuľka 3 Značenie produkčných médií

Zdroj dusíku	koncentrácia soli (mol/l)	Číslo na banke
močovina	0,0	1
močovina	0,5	2
močovina	1,0	3
močovina	2,0	4
Síran amónny	0,0	5
Síran amónny	0,5	6
Síran amónny	1,0	7
Síran amónny	2,0	8

#### 4.4.1.3 Kultivácia na odpadných substrátoch

Na kultiváciu kvasiniek boli použité dva odpadné substráty – srvátka a perie. Produkčné médiá mali 40 ml.

Lyofilizovaná srvátka bola rozpustená vo vode (100 g/l) a bola upravená hydrolýzou laktózy, ktorú skúmané kvasinky neutilizujú, pomocou prípravku obsahujúceho enzým laktázu dostupného v lekárni. Hydrolýza trvala 24 hodín za laboratórnych podmienok za stáleho miešania na magnetickej miešačke.

Stanovením na kvapalinovom chromatografe bol zistený obsah glukózy (40 g/l) a galaktózy (60 g/l), rozdiel v koncentrácii monosacharidov pochádzajúcich z laktózy bol spôsobený čiastočnou kontamináciou baktériami mliečneho kvasenia, ktorá bola v srvátke prítomná do jej sterilizácie. Kjeldahlovou metódou na stanovenie obsahu dusíku bol zistený obsah dusíku v sušine srvátky na 2 %, čiže v rozpustenej srvátke bol pomer C/N 9,3. Metódy stanovení su opísané v kapitolách 294.4.1.4 a 4.4.1.5.

Kultivovalo sa v hydrolyzáte srvátky pripravenom rozpustením 100 g sušenej srvátky v 1 litri vody, hydrolyzovanom prípravkom s laktázou a prídavkom príslušného množstva  $\text{H}_2\text{PO}_4$  a  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  podľa tabuľky Tabuľka 2.

Kultivácia na perí prebiehala podobne. Hydrolyzovalo sa 84 g peria v 500 ml vody s prídavkom 13 g NaOH 24 hodín na magnetickej miešačke za zvýšenej teploty. Perie obsahuje zväčša keratín, obsah dusíku sa stanovil Kjeldahlovou metódou na 17 g/l.

Z dôvodu, že perie neobsahuje dostatočný zdroj uhlíku pre rast kvasiniek, do produkčných médií sa pridávala glukóza spolu s anorganickými zdrojmi fosforu a horčíka  $\text{H}_2\text{PO}_4$  a  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  podľa tabuľky Tabuľka 2. Glukózy sa pridávalo také množstvo, aby sa dosiahol pomer C/N 16.

#### **4.4.1.4 Stanovenie celkového obsahu dusíka podľa Kjeldahla v odpadných substrátov**

Stanovenie obsahu dusíku Kjeldahlovou metódou sa aplikovalo na oba odpadné substráty. Pre oba substráty bol postup rovnaký. Do mineralizačných trubíc sa navážil 1 g sušenej srvátky a 1 ml hydrolyzovaného peria, pridalo sa 10 ml koncentrovanej kyseliny sírovej a 2 g Weiningerovho katalyzátoru. Trubice sa vložili do mineralizačného bloku a nechali sa mineralizovať, kým neboli číre. Po vychladnutí sa mineralizát previedol do destilačnej banky, pridal sa indikátor fenolftaleín, 40 ml 33% hydroxidu sodného a uvoľnený amoniak bol predestilovaný s vodnou parou do predlohy obsahujúcej 25 ml  $0,05 \text{ mol/dm}^3$  kyseliny sírovej. Predloha sa titrovala  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  odmerným roztokom hydroxidu sodného na Tashirov indikátor. Zo spotreby sa vypočítal obsah dusíka vo vzorke (Rovnica (1)).

$$w = \frac{\left[ c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - \left( \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \right) \right] \cdot 2 \cdot M}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100\% \quad (1)$$

#### **4.4.1.5 Stanovenie obsahu glukózy v srvátke kvapalinovým chromatografom**

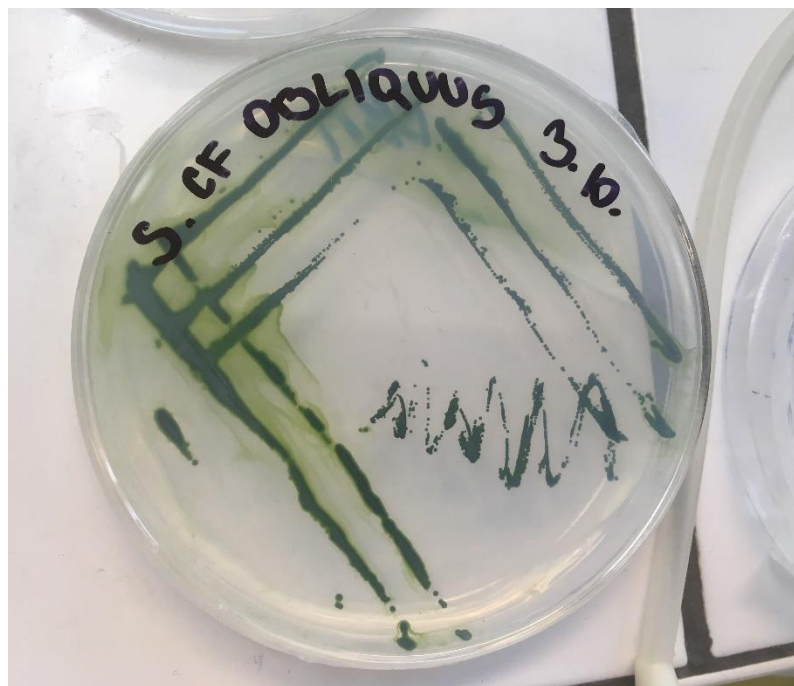
Stanovenie obsahu glukózy v rozpustenej srvátke prebehlo pomocou metódy UHPLC na prístroji Thermo Scientific s RI detektorom. 100 g lyofilizovanej srvátky bolo rozpustených v litri vody a laktóza bola enzymaticky hydrolyzovaná. Vzorka bola prefiltrovaná cez  $0,4 \mu\text{l}$  filter a analyzovaná na kvapalinovom chromatografe. Analýza prebiehala pri  $60^\circ\text{C}$  s prietokom  $1 \text{ ml/min}$  pri použití mobilnej fáze  $5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$ . Celková doba analýzy bola 15 minút a objem nastrekovanej vzorky činil  $20 \mu\text{l}$ . Bola použitá C18 kolóny Rezex ROA-SVBD ( $300 \times 7,8 \text{ mm}$ ) od firmy Phenomenex. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu Chromeleon.

### **4.4.2 Kultivácia rias**

Kultúry rias sú udržiavané na pevných živných pôdach a v zásobných roztokoch, z ktorých sa odoberá časť na zaočkovanie kultivačných fliaš. Riasy vyžadujú minerálne média so zdrojmi biogénnych a stopových prvkov, dostatok oxidu uhličitého ako zdroja uhlíka a zdroj svetla na fotosyntézu.

#### **4.4.2.1 Pevná pôda a zásobné médiá**

Riasy sú dlhodobo uschovávané na pevnej živnej pôde tvorenej minerálnym médiom určeným pre riasy BBM a agarom ( $20 \text{ g na liter}$ ), ako je znázornené na obrázku Obrázok 17.



Obrázok 17 Zásobná kultúra *Desmodesmus obliquus*

Pri používaní sa preočkujú do Erlenmayerovej banky a tvoria zásobnú kultúru na kultivácie. Riasy sú všeobecne náchylné na bakteriálnu kontamináciu, no sú schopné prežiť aj za jej prítomnosti, keďže využívajú iné zdroje uhlíku a nie sú závislé na externom zdroji kyslíka. Musia byť pravidelne čistené od baktérií stočením a doplnením čerstvým sterilným médiom. Zásobné kultúry s Erlenmayerových bankách stačí ponechať pod stálym zdrojom svetla na trepačke.

#### 4.4.2.2 Kultivačné médiá

V experimente boli sledované schopnosti mikrorias rásť a produkovať aktívne látky na rôznych zdrojoch dusíka. Boli použité močovina, síran amónny a dusičnan sodný. Riasy boli kultivované v Pirex fľašiach so zavedenými hadičkami na prevzdušňovanie filtrovaným vzduchom pre dostatok oxidu uhličitého v médiu. Kultivácia trvala približne dva týždne, niekedy kratšie, napríklad *Chlorella sorokiniana* na médiu so síranom amónnym prežila iba 4 dni. Každý alebo každý druhý deň bolo z média odoberaných asi 30 ml a bola stanovovaná absorbancia ako úmera koncentrácie buniek a pH média, ktoré ovplyvňuje životaschopnosť buniek.

Objem média bol 800 ml a bolo tvorené BBM médiom bez zdroja dusíku, ktoré sa pripravuje zo zásobných roztokov jednotlivých zložiek, ako je ukázané v tabuľke Tabuľka 4. Niektoré z týchto roztokov obsahujú ďalšie látky, ktoré sú rozpísané v nasledujúcich tabuľkách. BBM médium je jedným zo štandardných médií na kultiváciu rias [40].

Zdroj dusíku bol vždy pridaný pri očkovaní zo zásobných roztokov, aby bola koncentrácia dusíku rovnaká ako v pôvodnom recepte na BBM médium, čiže 2,94 mM. Obsah týchto zásobných roztokov a ich použité množstvo do 800 ml média je znázornené v tabuľke 8.

Tabuľka 4 Zloženie BBM média bez dusíku [40]

Zložka	Množstvo na prípravu 1 litru zásobného roztoku (g)	Pridané množstvo na liter média (ml)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,50	1 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,50	10 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7,50	10 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,50	10 ml
$\text{NaCl}$	2,50	10 ml
EDTA roztok	Tabuľka 5	1 ml
Kyslý roztok železa	Tabuľka 6	1 ml
$\text{H}_3\text{BO}_3$	11,42	1 ml
Roztok stopových prvkov	Tabuľka 7	1 ml

Zložka	Množstvo na 1 liter
EDTA	50,00 g
KOH	31,00 g

Tabuľka 5 Zloženie Roztoku EDTA [40]

Zložka	Množstvo na 1 liter
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (96%)	0,10 ml

Tabuľka 6 Zloženie kyslého roztoku železa [40]

Zložka	Množstvo na 1 liter
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,82 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,44 g
$\text{MoO}_3$	0,71 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,49 g

Tabuľka 7 Zloženie Roztoku stopových prvkov [40]

Látka	Množstvo na 100 ml roztoku (g)	Koncentrácia atómu dusíku (M)	Množstvo (ml) pridávané do 800 ml média BBM
Močovina	10,00	3,33	0,71
$\text{NH}_4\text{SO}_4$	10,00	1,51	1,55
$\text{NaNO}_3$	10,03	1,18	1,99

Tabuľka 8 Zloženie a množstvo roztokov, pridávaných do kultivačných médií, ako zdroj dusíka

## 4.5 Spracovanie biomasy

Po kultivácii sa biomasa spracúva za cieľom zakoncentrovať, zistiť nárast a uskladniť na ďalšie analýzy.

### 4.5.1 Biomasa kvasiniek

Po štvordňovej kultivácii kvasiniek sa z média odobralo 40 ml, na centrifúge stočilo, premylo 10 ml vody a opäť stočilo. Zakoncentrovaná biomasa bola prevedená do Eppendorfovej skúmavky a lyofilizovaná. Z rozdielu váh skúmavky pred a po naplnení a lyofilizácii sa prepočítal nárast.

### 4.5.2 Biomasa mikrorias

Z média rias boli vzorky odoberané aj počas kultivácie. Aby sa predišlo kontaminácii, odbery sa vykonávali dezinfikovanou striekačkou, rovnako sa dezinfikovali aj konce hadičiek etanolom. Odoberalo sa asi 30 ml média, boli zmerané absorbancia a pH, následne sa vzorka stočila, premyla a opäť stočila, bola prevedená do Eppendorfovej skúmavky a lyofilizovaná. Nárast z rozdielu váh skúmaviek bol vyhodnotený iba po poslednom odbere.

## 4.6 Extrakcie a HPLC analýza

Na analýzu kvapalinovým chromatografom sa navážilo do uzatvárateľných skúmaviek 10-15 mg lyofilizovanej biomasy, bolo pridaných 50-100 µl vody na rehydratáciu. Po pár minútach sa skúmavky s biomasou vložili do mrazničky, aby vzniknuté kryštály ľadu poškodili membrány buniek, a tak zefektívnili extrakciu látok.

K biomase sa pridali sklenené guľičky (asi 4-násobok objemu biomasy) a 1 ml acetónu a skúmavky boli vortexované 15 minút. Následne bola vrstva acetónu odpipetovaná do inej skúmavky a ku zvyšku biomasy bol pridaná ešte 1 ml acetónu a vortexovanie sa opakovalo. Často sa stalo, že po skončení trepania bola acetónová fáza zakalená rozbitými časťami buniek, v tom prípade sa skúmavky centrifugovali pred odberom.

Roztok acetónu a látok v ňom rozpustených bol odparený v termobloku za prívodu dusíka. Dusík vytváral inertnú atmosféru a tak zamedzoval oxidácii oxilabilných látok ako sú aj karotenoidy.

Zbytok po odparení sa rozpustil v 1 ml etylacetátu s HPLC čistotou (v prípade veľmi koncentrovanej vzorky aj vo väčšom objeme) a bol prefiltrovaný 20 µm filtrom s teflónovou membránou do 1,8 ml vialky. Takto pripravené vzorky sa použili na meranie, alebo sa mohli uchovať v mraze.

Dĺžka analýzy na HPLC bola 19 minút a prietokom 1 ml/min. Detektor používaný pri analýze bol PDA – detektor s diódovým poľom snímajúci celé spektrum v troch kanáloch: 455 nm, 445 nm (karotenoidy a chlorofyly) a 285 nm (steroly a ubiquinón).

Boli použité dve mobilné fázy – A a B, ktorých zloženie a elučný program je v Tabuľkách Tabuľka 9 a Tabuľka 10.

Namerané chromatogramy boli vyhodnotené v programe Xcalibur a prevedené do MS Excel, kde boli cez kalibračné rovnice jednotlivých látok prepočítané obsahy látok vo vzorke.



MF A		MF B	
Zložka	Podiel (%)	Zložka	Podiel (%)
Acetonitril	84	Metanol	60
Metanol	2	Etylacetát	40
Tris HCl pufer pH = 8	14		

Tabuľka 9 Zloženie mobilných fáz

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	100	0
10	0	100
14	0	100
15,3	100	0
19	100	0

Tabuľka 10 Elučný program

#### 4.7 GC analýza

Obsah lipidov a zloženie mastných kyselín sa zisťovalo na plynovom chromatografe. Príprava vzorky mala dva kroky: transesterifikáciu a extrakciu vzniknutých metylesterov mastných kyselín.

10-15 mg lyofilizovanej biomasy sa navážilo do krymplovacích skúmaviek a pridá sa 1,8 ml transesterifikačnej zmesi, ktorej zloženie je 15 obj.% roztok  $H_2SO_4$  v metanole s obsahom interného štandardu – kyseliny heptadekanovej  $C_{17}$  v koncentrácii 0,5 g/l. Skúmavka sa zakrympluje a inkubuje dve hodiny v termobloku pri 85 °C, kedy prebehne transesterifikácia mastných kyselín.

Po ochladení sa do 4 ml vialky pridá 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH, vleje sa obsah krymplovacej skúmavky a pridá sa 1 ml hexánu pre HPLC. Túto zmes extrahujeme na multipozičnom vortexe. Po 3-5 minútach sa počká na ustálenie fáz a z hornej hexánovej vrstvy sa odpipetuje 0,1 ml do GC vialky a doplní 0,9 ml hexánu pre HPLC. Takto pripravené vzorky sa môžu analyzovať na GC alebo ponechať v mraze.

Bol použitý plynový chromatograf Trace GC s automatickým dávkovačom, objem dávkovanej vzorky bol 0,1  $\mu$ l. Analýza na GC prebieha za 250 °C s prietokom 1 ml/min, nosný plyn je vodík a analýza trvala 25,5 minúty. Na detekciu jednotlivých zložiek prístroj využíval plameňový ionizačný detektor.

Získané hodnoty boli vyhodnotené v programe x, prevedené do MS Excel a spracované. Vyhodnocovaný bol celkový obsah lipidov a pomer nasýtených, mononenasýtených a polynenasýtených mastných kyselín.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Stanovenie nárastu biomasy kvasiniek

Rozdiely hmotností Eppendorfových skúmaviek pred a po lyofilizácii biomasy boli prepočítané podľa objemu odobratého média na gram biomasy na liter média. Tabuľky so zistenými zárastami biomasy sú uvedené v Prílohách 1-6.

*C. infirmominiatum* mal vysoké nárasty pri C/N pomere 16 a 25, najvyšší pri pomere 16, močovine ako zdroji dusíka a obsahu NaCl 1 mol/l (10,03 g/l). Pri všetkých pomeroch vychádza močovina ako prijateľnejší zdroj dusíku v porovnaní so síranom amónnym. Koncentrácia soli výrazne ovplyvňovala nárast, pri všetkých pomeroch nárast klesal s obsahom soli.

*S. salmonicolor* mal vysoké nárasty pri pomeroch 16 a 50, celkovo najvyšší pri pomere 16, sírane amónnom a koncentrácii soli 0,5 mol/l (10,98 g/l). Zdroje dusíka močovina a síran amónny sa zdali byť pre tento druh kvasinky rovnocenné, nie je výrazný rozdiel v náraste. Zvyšujúca sa koncentrácia soli znižovala nárast biomasy.

*S. metaroseus* narástol najviac pri pomeroch 16, 25 a 50, najvyšší nárast bol pri pomere C/N 16, močovine a obsahu soli 1 mol/l (10,92 g/l). Pri pomere 25 a 50 boli močovina a síran amónny ako zdroje dusíka rovnocenné, ale pri pomere 16 a 100 bola vhodnejšia močovina. Soľ bola preferovaná v čo najnižšej koncentrácii, s výnimkou pri C/N 16 a zdroji N močovine, kedy bola vyššia koncentrácia soli preferovaná.

*R. mucilaginosus* mala vysoký nárast pri pomere C/N 16, najlepšie podmienky predstavoval pomer C/N 16, zdroj dusíku močovina a obsah soli 0,5 mol/l (13,49 g/l). Pri pomeroch 16 a 100 jej nárast indukoval viac zdroj dusíka močovina, ale síran amónny bol o trochu vhodnejší v pomeroch 25 a 50. So zvyšujúcim sa obsahom NaCl produkcia biomasy klesala, s výnimkou pomeru C/N 16, kedy bola najvyššia pri obsahu soli 0,5 mol/l.

Kultivácie na srvátke mali nárasty najvyššie. Najviac sa na nej darilo *C. infirmominiatum* (17,57 g/l). Nárast všetkých kvasiniek bol na srvátke výrazne vyšší ako na médiu s močovinou či síranom amónnym. S rastom obsahu NaCl klesala vyprodukovaná biomasa, ale aj pri koncentrácii 2 mol/l sa nárast dá porovnať s najlepšimi výsledkami prvých kultivácií.

Použitá forma hydrolyzáta peria sa ukázala ako vhodný substrát na rast kvasiniek. Rovnako ako pri srvátke, obsah soli znižoval nárast. Okrem kvasinky *S. salmonicolor*, sa ostatným druhom na hydrolyzáte peria darilo porovnateľne s prvými kultiváciami.

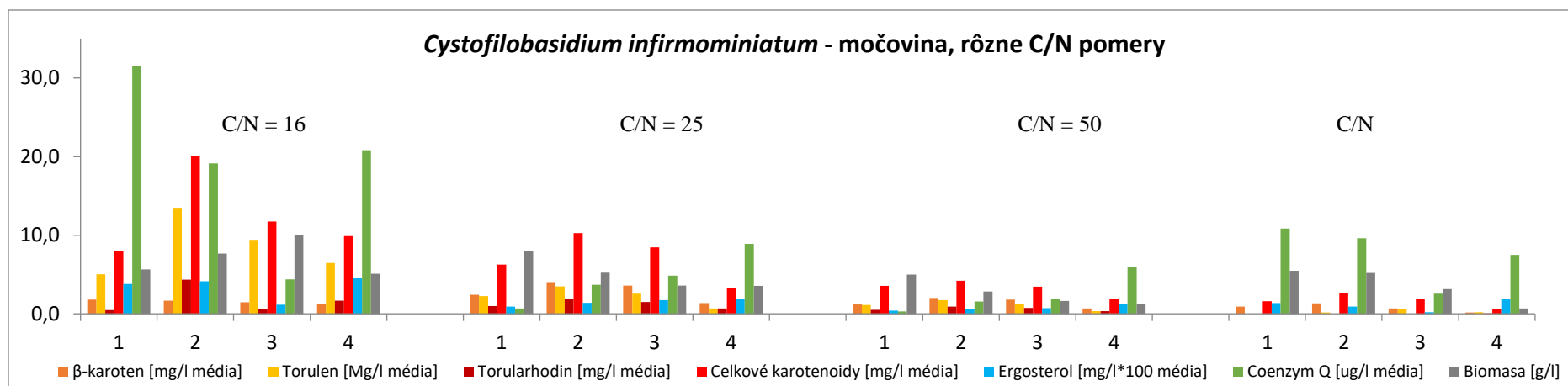
### 5.2 Stanovenie produkcie aktívnych látok kvasinkami metódou HPLC

#### 5.2.1 Druh *Cystofilobasidium infirmominiatum*

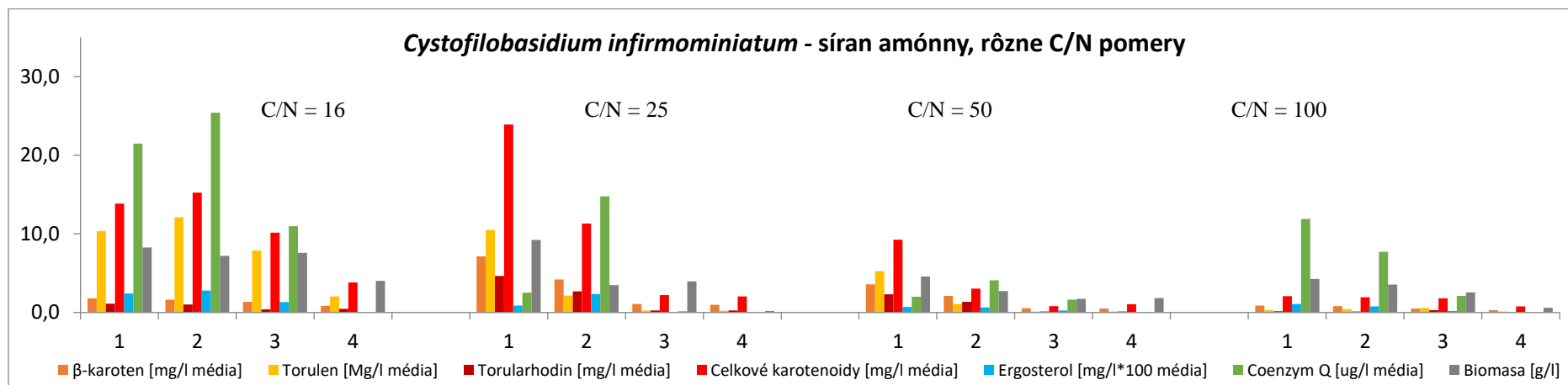
Z grafov Graf 1 a Graf 2 sa dá usudzovať, že pre celkovú produkciu aktívnych látok sú pozorované zdroje dusíka rovnocenné. Z použitých pomerov C/N v oboch sériách vyšiel C/N 16 ako najvhodnejší, zato C/N 50 ako najhorší.

Karotenoidy celkovo boli produkované v najvyššej miere s použitím síranu amónneho, 0 mol/l NaCl na pomere C/N 25 (23,9 mg/l) a na močovine pri 0,5 mol/l soli, C/N pomere 16 (20,1 mg/l).  $\beta$ -karotén bol produkovaný v malých množstvách vo všetkých sériách, vyššiu mieru dosiahol pri pomere 25, najviac na sírane amónnom a s obsahom soli 0 mol/l (7,2 mg/l).

Produkcia ergosterolu bola zaznamenaná vo väčšej miere iba v sériách s močovinou, pomer C/N 16 (46  $\mu$ g/l).



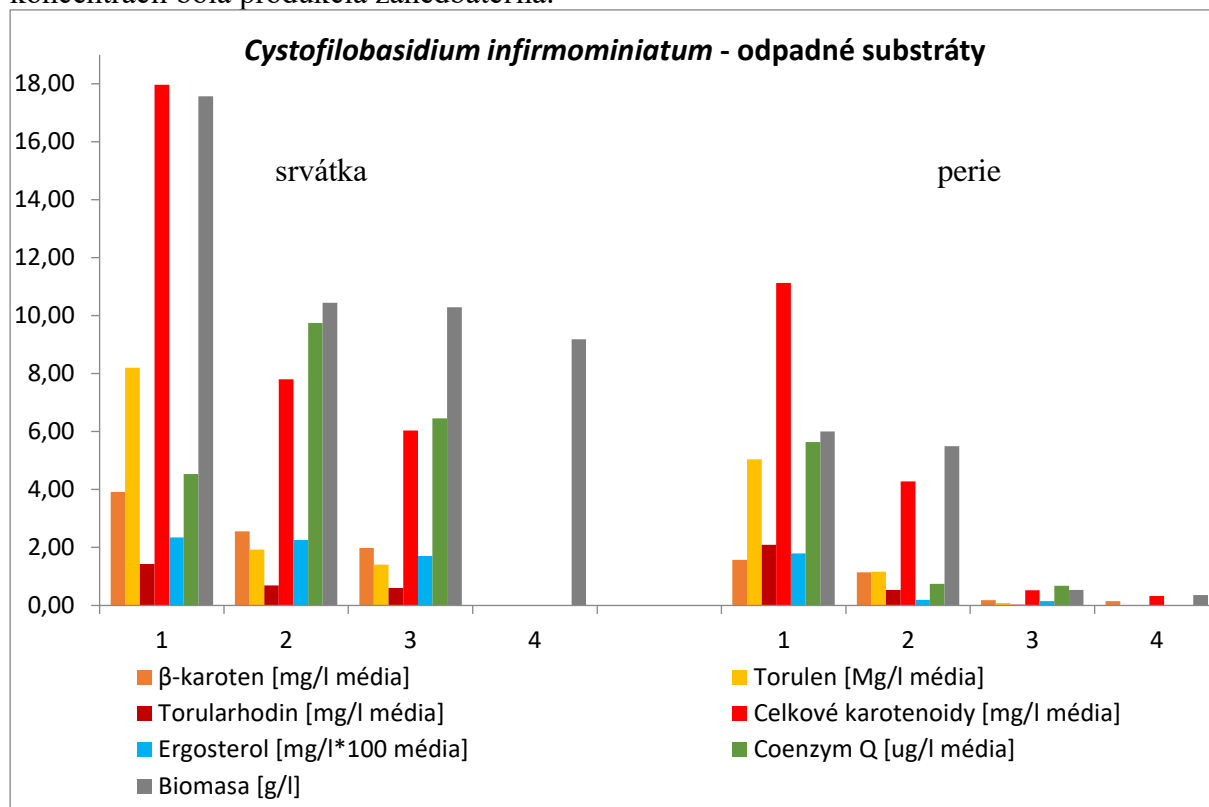
Graf 1 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *C. infirmominiatum* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 2 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *C. infirmominiatum* po 4 dňoch kultivácie na médiu so síranom amónnym ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)

Na grafe Graf 3 je znázornené, že produkcia látok na srvátke bola porovnateľná s produkciou na sírane amónnom. Bolo vyprodukovaných celkovo menej karotenoidov, kvôli malej tvorbe torulénu, ale obsah pigmentov v kultivácii bez obsahu soli bol 17,97 mg/l a obsah  $\beta$ -karoténu bol vyšší ako na médiu s močovinou (8,2 mg/l). Koenzýmu Q bolo vyprodukovaného najviac pri obsahu soli 1 mol/l (9,75  $\mu$ g/l).

Na hydrolyzáte peria boli látky produkované iba s obsahom soli 0 alebo 0,5 mol/l, pri vyššej koncentrácii bola produkcia zanedbateľná.



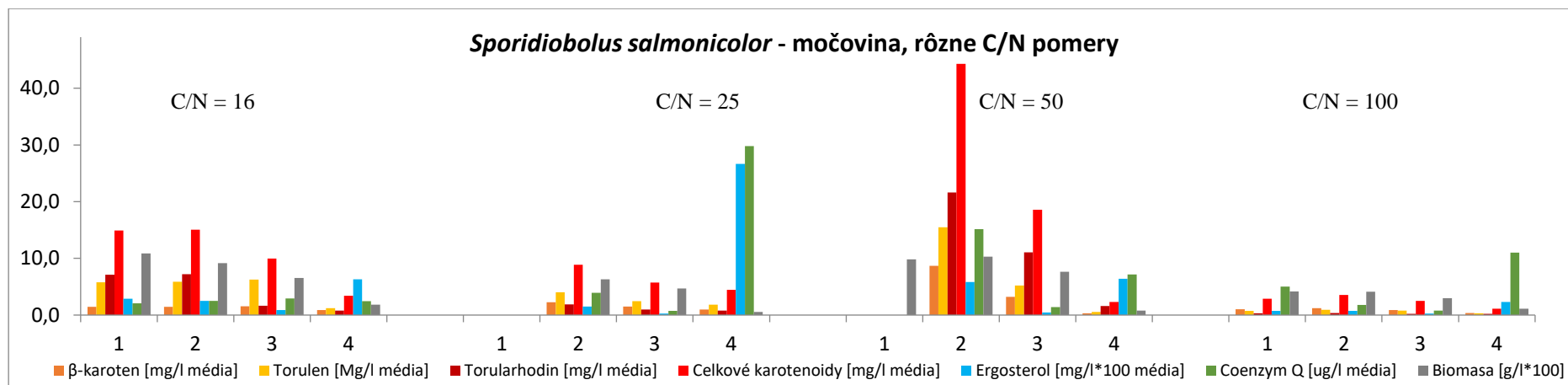
Graf 3 Histogram pigmentových a sterolických látok vyprodukovaných kvasinkou *C. infirmominiatum* po 4 dňoch kultivácie na médiu z odpadných substrátov – srvátke a perie s rôznymi koncentraciami NaCl.

### 5.2.2 Druh *Sporidiobolus salmonicolor*

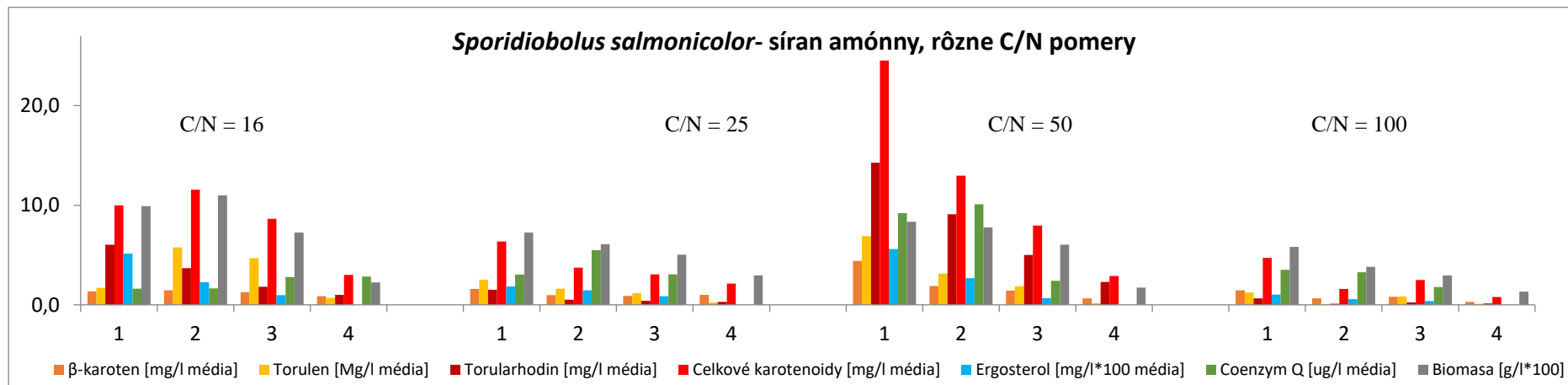
Z grafov Graf 4 a Graf 5 plynie, že najlepší pomer C/N pre produkciu aktívnych látok pre *S. salmonicolor* je 50 a zdroj dusíku močovina. Významná produkcia karotenoidov bola dosiahnutá pri pomere 50, obsahu soli 0,5 mol/l a močovine (44,3 mg/l). Ergosterol a koenzým Q boli vo vyššej koncentrácii vyprodukované pri pomere 25, obsahu soli 2 mol/l (ergosterol 267  $\mu$ g/l, CoQ 29,8  $\mu$ g/l).

Na srvátke bola dosiahnutá produkcia látok podobná ako na médiu s močovinou a síranom amónnym pri pomere C/N 16, (Graf 6). Najvyšší obsah karotenoidov bol pri 0 mol/l soli (12,68 mg/l), ale obsah vyprodukovaného koenzýmu Q bol vyšší ako priemerný obsah pri kultiváciách na médiách s močovinou alebo síranom amónnym, a to 17,4  $\mu$ g/l pri 0,5 mol/l soli.

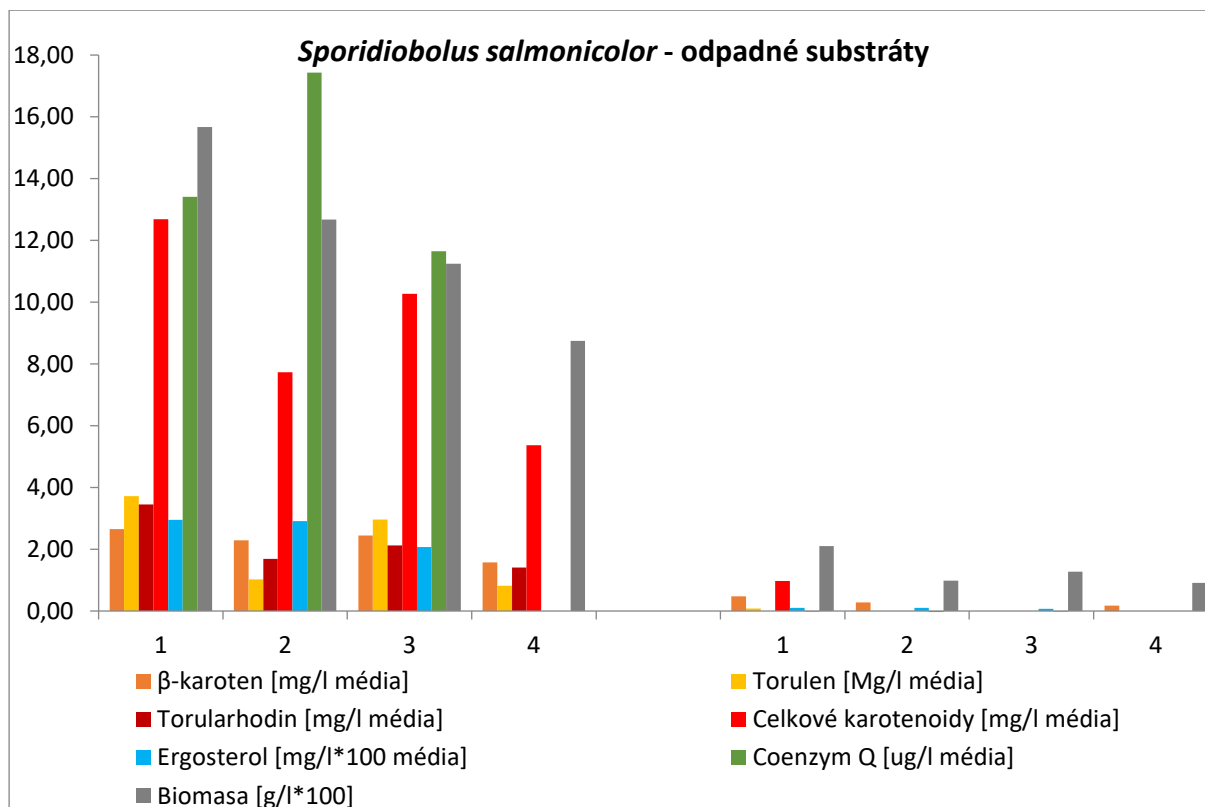
Látky produkované kvasinkou rastúcou na hydrolyzáte peria bol minimálny a zanedbateľný.



Graf 4 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *S. salmonicolor* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer(16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 5 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *S. salmonicolor* po 4 dňoch kultivácie na médiu so síranom amónnym ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer(16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 6 Histogram pigmentových a sterolických látok vyprodukovaných kvasinkou *S. salmonicolor* po 4 dňoch kultivácie na médiu z odpadných substrátov – srvátke a perii s rôznymi koncentraciami NaCl.

### 5.2.3 Druh *Sporidiobolus metaroseus*

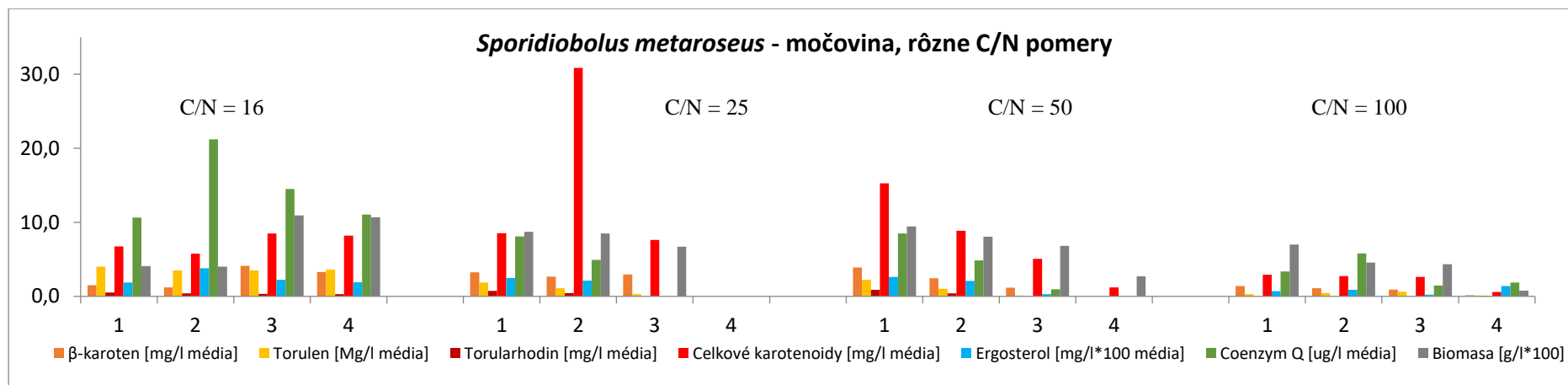
Z porovnania grafov Graf 7 a Graf 8 vyplýva, že pri C/N pomeroch 25, 50 a 100 nie je v produkcii látok na rôznych dusíkatých zdrojoch zásadný rozdiel, ale pri pomere 16 je síran amónny ako zdroj dusíku vhodnejší. Avšak najvyššia produkcia karotenoidov bola zaznamenaná pri močovine, pomere 25 a obsahu soli 0,5 mol/l (30,8 mg/l). Torularhodín nebol na týchto médiách výrazne produkovaný, zato pri použití srvátky bol (Graf 9).

Najvýznamnejší obsah koenzýmu Q bol dosiahnutý za podmienok C/N pomeru 16, na sírane amónnom a obsahu soli 0 mol/l (22,4 μg/l). Pri sérii so síranom amónnym, pomer 16 je viditeľné, ako je zvýšenie produkcie koenzýmu na úkor produkci karotenoidov. Produkcia ergosterolu nebola celkovo významná, maximum bolo dosiahnuté na pomere 16, s použitím močoviny a soli v koncentrácii 0,5 (38 μg/l).

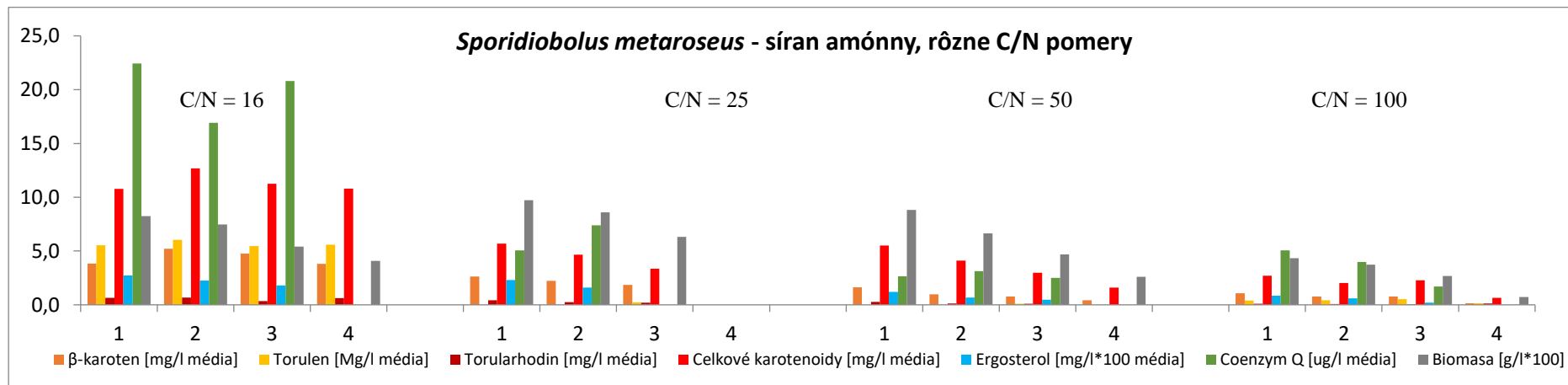
Použitie srvátky na kultiváciu *S. metaroseus* prinieslo produkciu torularhodínu, na rozdiel od použitia močoviny alebo síranu amónneho. Torularhodín bol aj majoritne produkovaný karotenoid. Celkový obsah karotenoidov bol vyšší ako pri použití síranu amónneho, najviac pri obsahu soli 0,5 mol/l (13,72 mg/l).

Produkcia koenzýmu Q bola na srvátke potlačená a nižšia ako v predošlých kultiváciách, najvyšší obsah bol dosiahnutý pri koncentrácii soli 0 mol/l (5,51 μg/l).

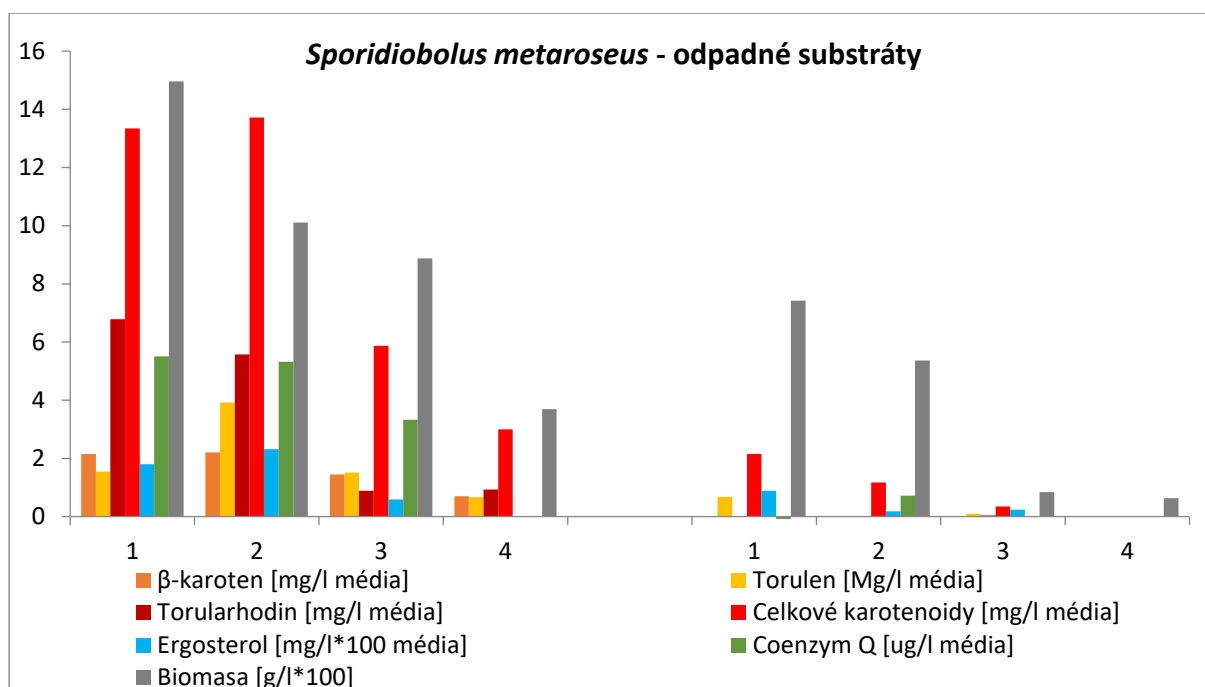
S použitím peria nebola produkcia aktívnych látok vysoká, iba bez obsahom soli boli produkované pigmenty a ergosterol v malých množstvách, pri koncentrácii 0,5 mol/l karotenoidy a koenzým Q.



Graf 7 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *S. metaroseus* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 8 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *S. metaroseus* po 4 dňoch kultivácie na médiu so síranom amónnym ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 9 Histogram pigmentových a sterolických látok vyprodukovaných kvasinkou *S. metaroseus* po 4 dňoch kultivácie na médiu z odpadných substrátoch – srvátke a perí s rôznymi koncentraciami NaCl.

#### 5.2.4 Druh *Rhodotorula mucilaginosa*

Z pozorovania grafov Graf 10 a Graf 11 vyplýva, že produkcia aktívnych látok bola s použitím močoviny a síranu amónneho podobná, rozdiel vidno iba v pomere C/N 25, kde je vyššia produkcia karotenoidov u sérií so síranom amónnym. Najväčší obsah karotenoidov dosiahla kultivácia na sírane amónnom, C/N pomere 25 a koncentrácii soli 0 mol/l (21,3 mg/l), pri týchto podmienkach bol aj najvyšší obsah β-karoténu (6,5 mg/l), inak bol majoritne produkovaný pigment torularhodín.

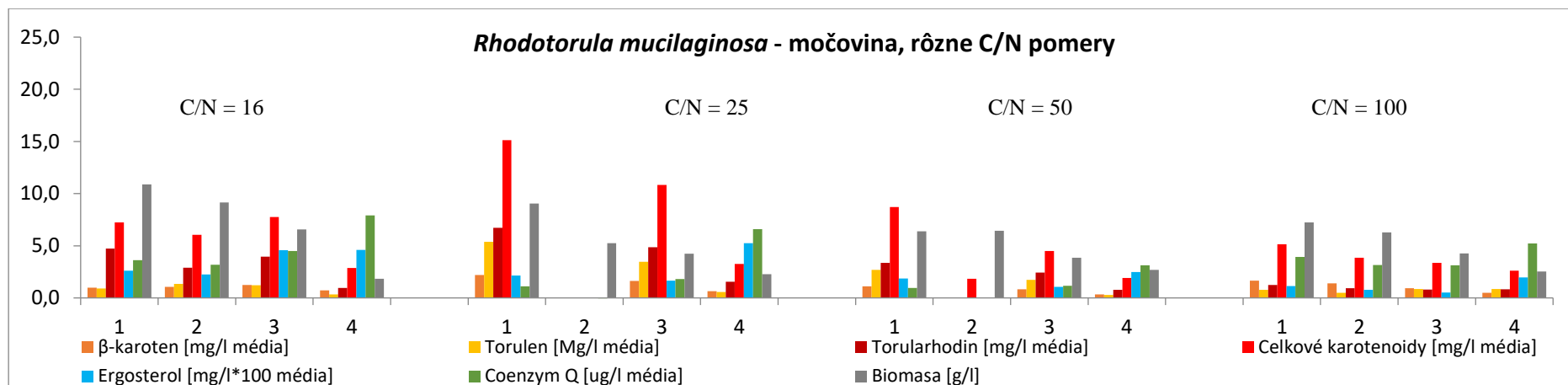
Produkcia koenzýmu Q na médiách s obsahom močoviny stúpala s koncentraciou NaCl a naopak, s použitím síranu amónneho klesala s obsahom soli. Rovnaký trend platil aj pre produkciu ergosterolu. Najvyšší obsah CoQ bol pri močovine, 2 mol/l koncentrácii soli a pomere C/N 16 (7,9 µg/l), ergosterolu pri močovine, C/N pomere 25, 2 mol/l koncentrácii soli (52 µg/l).

Z grafu Graf 12 je zrejmé, že kultivácia *R. mucilaginosa* na srvátke je vhodná na produkciu aktívnych látok. Vďaka vysokej produkcii torulénu celkový obsah karotenoidov dosiahol najlepšie hodnoty kultivácií s použitím močoviny aj síranu amónneho. β-karotén bol produkovaný iba v malom množstve pri koncentrácii soli 2 mol/l, kedy už klesol obsah torulénu. Najvyššia produkcia celkových pigmentov bola bez obsahu soli (23,1 mg/l), z toho bolo torulénu 16,65 mg/l. Nulový obsah soli rovnako indukoval produkciu koenzýmu Q, ale najvyšší obsah CoQ (14,2 µg/l) bol dosiahnutý s koncentraciou soli 1 mol/l.

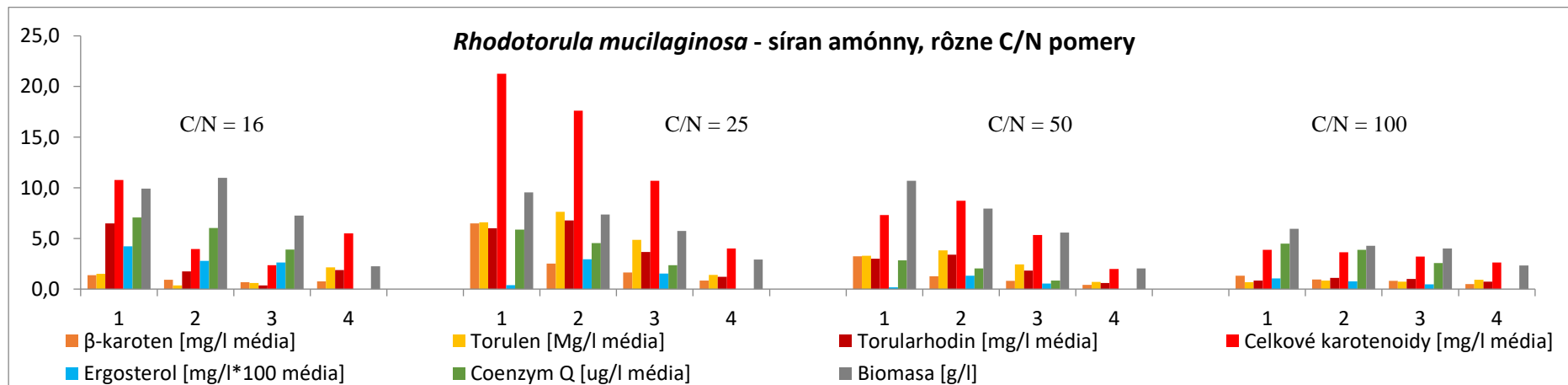
*R. mucilaginosa* sa ukázala ako jediný druh skúmaných kvasiniek, ktorým vyhovoval hydrolyzát peria ako substrát na produkciu aktívnych látok. Obsah karotenoidov bol podobný ako s použitím močoviny či síranu amónneho. Najvyššiu hodnotu dosiahla koncentrácia soli 0,5 mol/l (15,65 mg/l), z toho 8,17 mg/l torulénu. Bol produkovaný aj β-karotén a to s obsahom



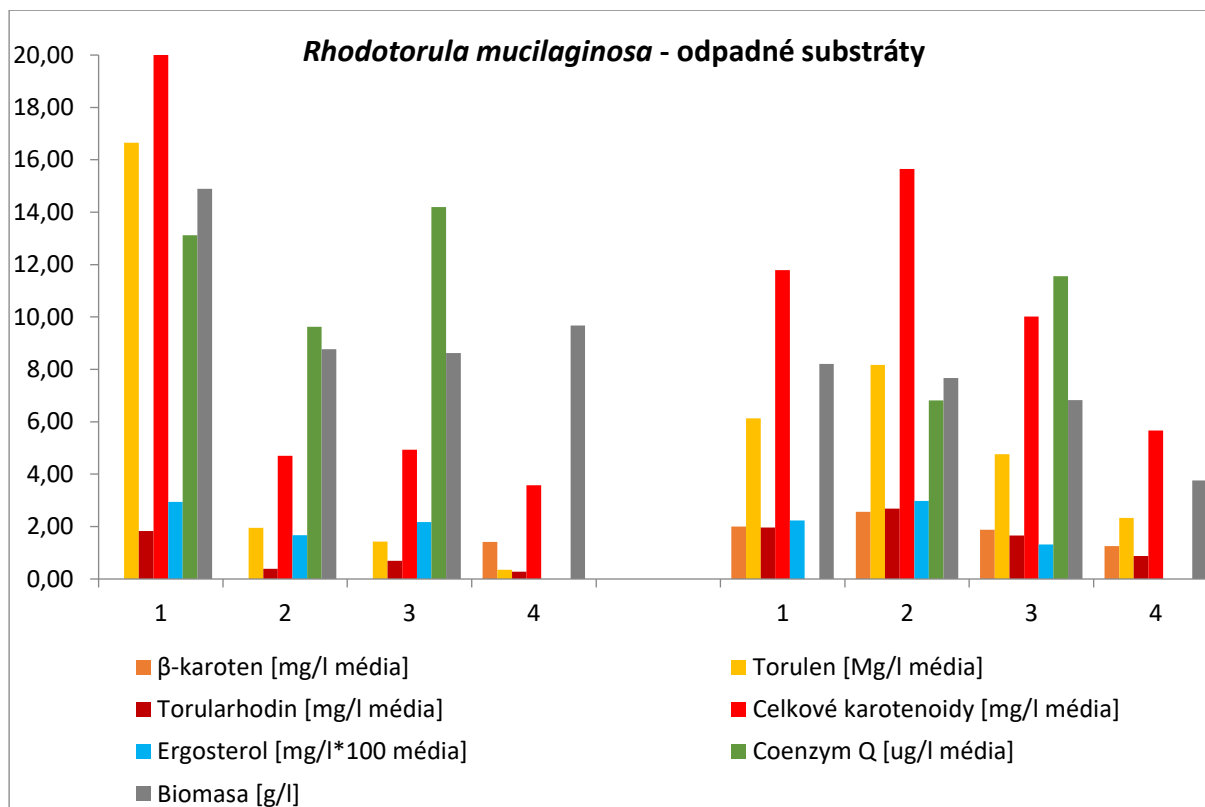
podobným torularhodínu, najviac pri obsahu soli 0,5 mol/l (2,56 mg/l). Najvyšší obsah CoQ bol nameraný pri obsahu soli 1 mol/l (11,56 µg/l).



Graf 10 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *R. mucilaginosa* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer(16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 11 Histogramové znázornenie produkcie pigmentových a sterolických látok kvasinkou *R. mucilaginosa* po 4 dňoch kultivácie na médiu so síranom amónnym ako zdrojom dusíka. Jednotlivé skupiny histogramov zobrazujú rôzne C/N pomer(16, 25, 50, 100) a rôzne koncentrácie NaCl (1,2,3,4)



Graf 12 Histogram pigmentových a sterolických látok vyprodukovaných kvasinkou *R. mucilaginosa* po 4 dňoch kultivácie na médiu z odpadných substrátach – srvátke a perí s rôznymi koncentraciami NaCl.

### 5.3 Stanovenie produkcie lipidov kvasinkami metódou GC

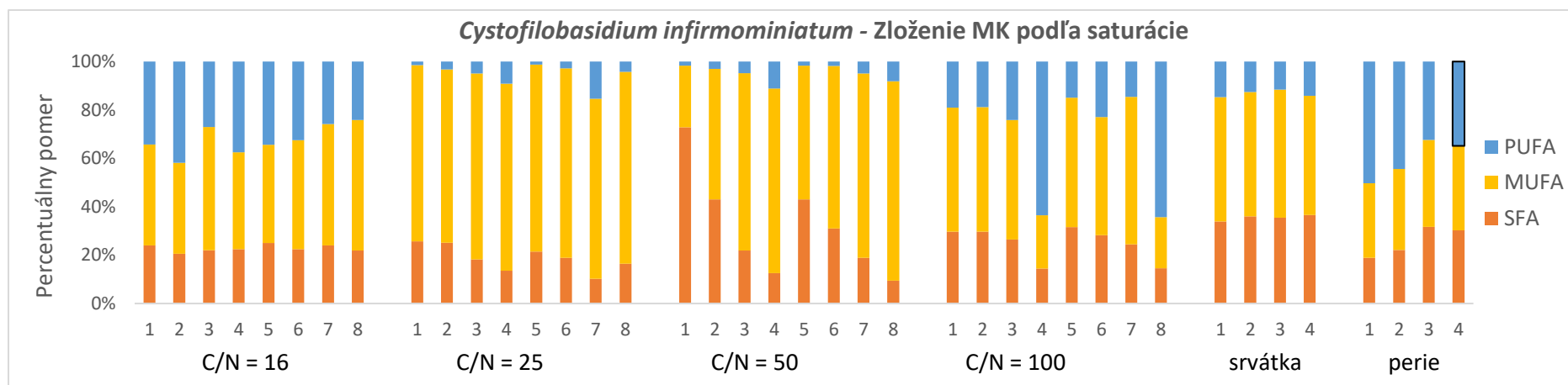
Lipidy boli z biomasy extrahované v podobe metylesterov a analyzované na plynovom chromatografe. Vyhodnocovaný bol ich profil z hľadiska nasýtenosti a percentuálny obsah v sušine, ktorý bol prepočítaný na obsah lipidov na liter média.

#### 5.3.1 Druh *Cystofilobasidium infirmominium*

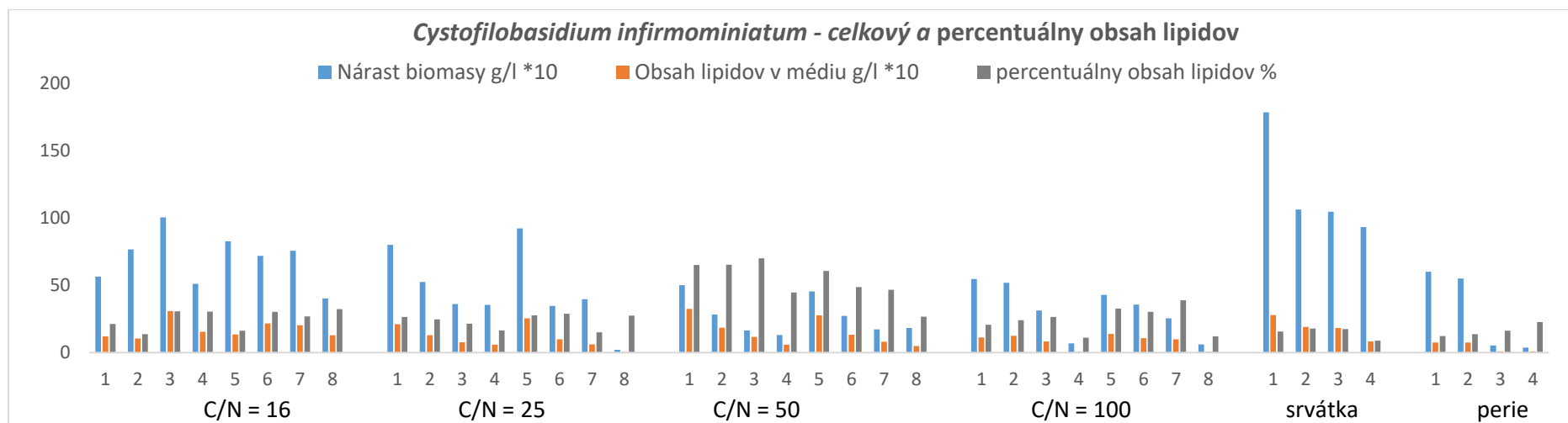
Z výsledkov analýzy lipidov vyprodukovaných kvasinkou zobrazených na grafe Graf 13 bolo zistené, že typ zdroju dusíka nemá efekt na nasýtenosť mastných kyselín. Obsah soli nemal zásadný vplyv, okrem série kultivácií na perí, kedy soľ znižovala obsah polynenasýtených MK (PUFA) a v prípade pomeru C/N 100 pri koncentrácii soli 2 mol/l výrazne zvýšila obsah PUFA. Pomerne najviac PUFA bolo nasyntetizovaných pri C/N pomere 16 (30-40 % sušiny).

Kultivácia na srvátke viedla k nižšej produkcii PUFA a vyššej produkcii SFA ako pri ostatných médiách, naopak pri použití peria bol obsah PUFA zvýšený na úkor obsahu mononenasýtených MK.

Z grafu Graf 14 plynie, že percentuálne najvyšší podiel biomasy tvorili lipidy pri pomere C/N 50 (26-70 %), najmenší pri perí (12-22 %). NaCl nemal na produkciu lipidov rovnomerný vplyv, pri C/N pomere 50 ich produkciu znižovala, pri C/N pomere 100 a médiu z peria ju naopak zvyšovala. Ani zdroj dusíku v podobe močoviny alebo síranu amónneho nemal opakovaný efekt na ich obsah. Najvyššia produkcia lipidov na liter médiá bola dosiahnutá pri C/N pomere 50, na médiu s močovinou a bez NaCl (3,2 g/l).



Graf 13 Diagramové zobrazenie pomeru mastných kyselín vyprodukovaných kvasinkou *C. infirmominiatum* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou (1-4) a síranom amónnym (5-8) ako zdrojom dusíka, pri rôznych koncentráciách NaCl. Jednotlivé skupiny diagramu zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a posledné dve skupiny kultiváciu na srvátke a perí.



Graf 14 Histogram zobrazujúci vyprodukované lipidy a ich percentuálny obsah voči biomase kvasinkou *C. infirmominiatum* na rôznych C/N pomeroch a odpadných substrátoch srvátke a perí. V rámci kultivácií sú zdroje dusíka močovina (1-4) a síran amónny (5-8) a rôzne koncentrácie NaCl.

### 5.3.2 Druh *Sporidiobolus salmonicolor*

Pri sériách kultivácie *S. salmonicolor* nebol pozorovaný vplyv močoviny a síranu amónneho ako zdrojov dusíka na nasýtenosť MK, ale bolo zistené, že obsah soli zvyšuje produkciu polynenasýtených mastných kyselín (Graf 15). Takisto pomer C/N mal vplyv na saturáciu, so zvyšujúcim sa C/N pomerom sa zvýšil obsah PUFA, medzi pomermi 16 a 100 bol rozdiel +15 %, bez zvýšenia obsahu SFA.

Kultivácie na srvátke a perí neboli výrazne ovplyvňované obsahom soli a pomery boli približne vyrovnané – PUFA 20-30 %, MUFA 45-55 %, SFA 20-30 %.

Percentuálny obsah lipidov v sušine bol vo všetkých C/N pomeroch aj v kultiváciách na odpadných substrátoch veľmi vyrovnaný 10-22 % (Graf 16). Obsah soli spôsoboval plytké klesanie produkcie lipidov. Najväčší obsah lipidov na liter médiá poskytla kultivácia na srvátke bez obsahu soli (3,1 g/l).

### 5.3.3 Druh *Sporidiobolus metaroseus*

Ani na lipidickú produkciu kvasinky *S. metaroseus* zdroj dusíka nemal zásadný vplyv (Graf 17). NaCl pri pomeroch C/N 16, 25 a 50 mal vplyv až v koncentrácii 2 mol/l, kedy spôsobil výrazné zvýšenie produkcie PUFA a zároveň jemné zníženie obsahu SFA. Zvyšujúci sa pomer C/N zvyšoval aj obsah PUFA, zato neovplyvňoval obsah nasýtených MK.

Kultivácie na srvátke a perí dosiahli podobné výsledky, a to obsah SFA 25-35 %, MUFA 45-70 %, PUFA 10-30 %, bez výrazného vplyvu koncentrácie NaCl.

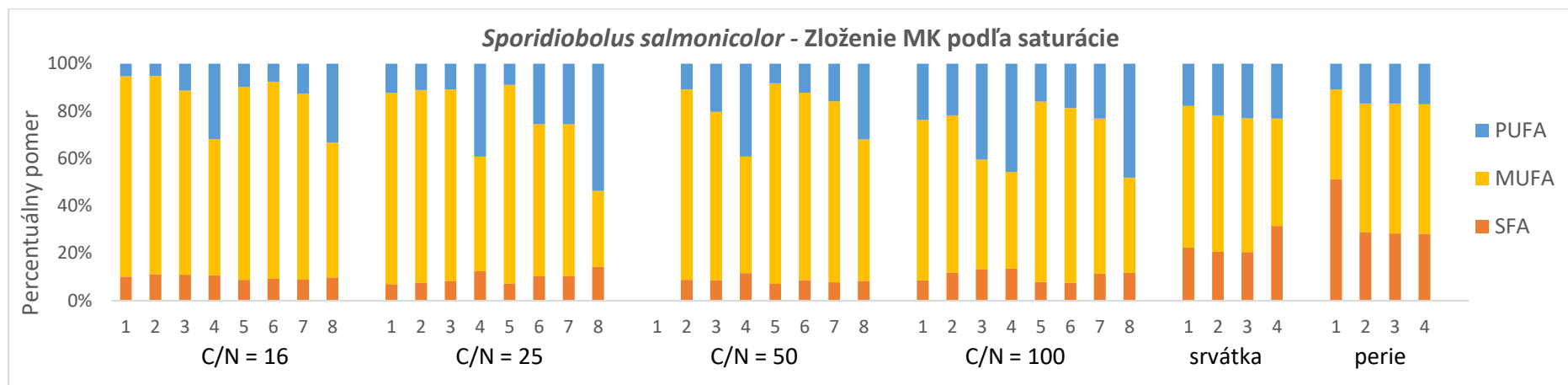
Celkový najvyšší obsah lipidov v sušine bol zistený pri pomere C/N 16 (20-50 %) a pri kultivácii s perím (až 50 %). Naopak srvátka ako substrát vykázala podmienky na najnižšie produkcie lipidov (Graf 18). Soľ vplývala rôzne, pri C/N pomere 16, 25 a médiách z peria boli s vyššou koncentráciou soli dosiahnuté menšie obsahy lipidov, na kultivácie v pomere C/N 50 a so srvátkou nemala vplyv a média s C/N pomerom 100 ovplyvnila pozitívne. Najvyšší obsah lipidov obsahovalo médium s močovinou, C/N pomerom 16 a bez obsahu soli (3,6 g/l).

### 5.3.4 Druh *Rhodotorula mucilaginosa*

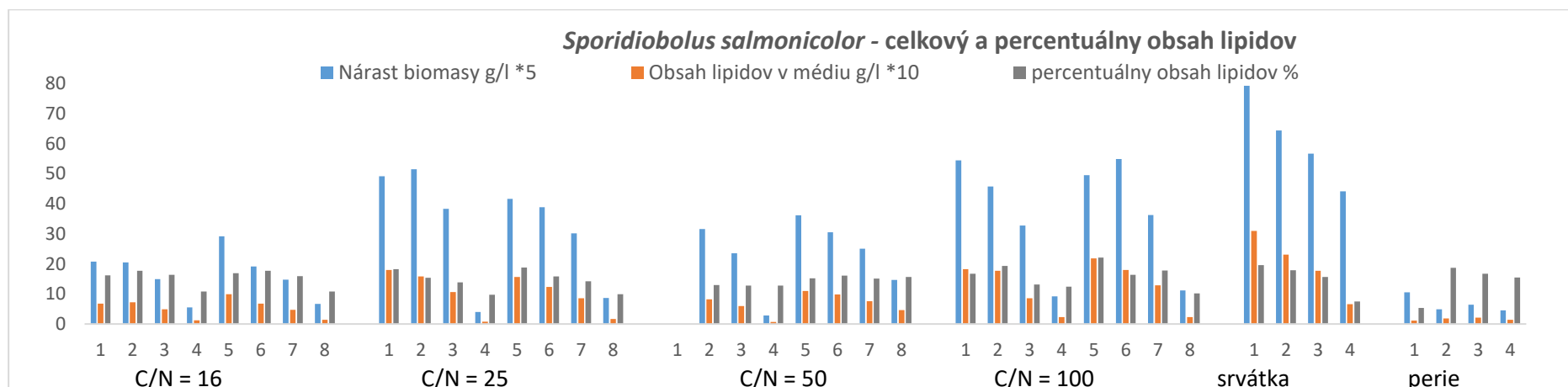
Distribúcia mastných kyselín sa podľa Graf 19 javí neovplyvnená zdrojom dusíka, až na kultiváciu s močovinou pri C/N pomere 100, kedy močovínové média obsahovali vyšší podiel PUFA. Obsah soli taktiež zvyšoval podiel PUFA v C/N pomeroch 16, 25 a 50 a so zvyšujúcim sa C/N pomerom sa zvyšoval aj obsah polynenasýtených MK. Celkový podiel SFA sa nemenil, nebol ovplyvnený ani jedným zo spomínaných faktorov.

Kultivácie so srvátkou poskytli mastné kyseliny s vyššou nasýtenosťou – SFA 30-50 %, PUFA 5-15 %. Perie malo bez vplyvu soli rovnaký obsah vo všetkých koncentráciách (PUFA 20 %, MUFA 5 %, SFA 20 %) (Graf 20).

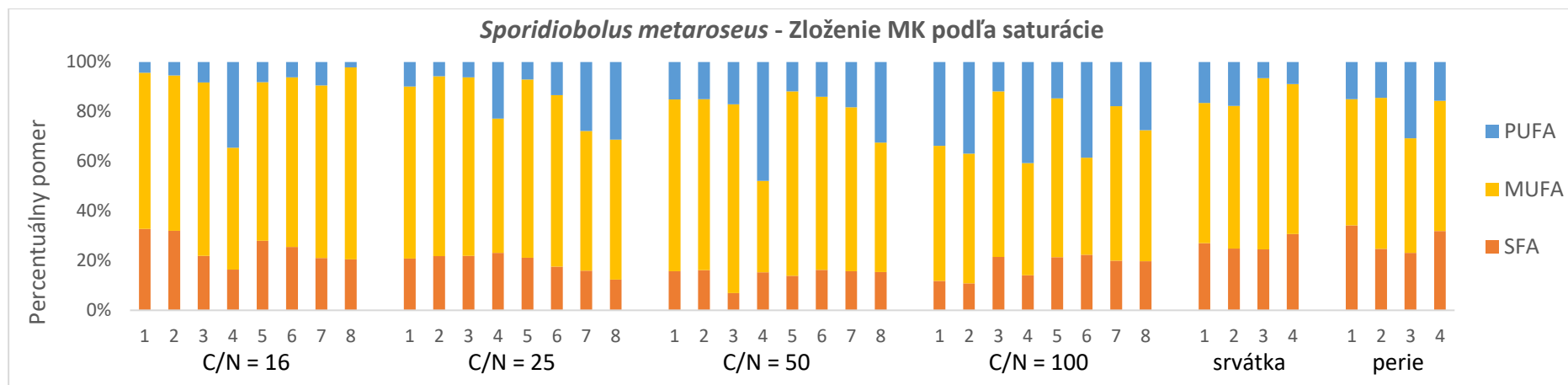
Percentuálne najvyššie zastúpenie lipidov na sušinu bolo zistené u C/N pomeru 25 (43 %), pri C/N pomere 100 naopak najnižšie (3-11 %). Obsah soli ani druh zdroju dusíku nemal výrazný vplyv na produkciu lipidov. Najviac lipidov obsahovalo médium s močovinou, bez NaCl pri pomere C/N 25 (2,7 g/l) a médium so srvátkou bez NaCl (3,8 g/l).



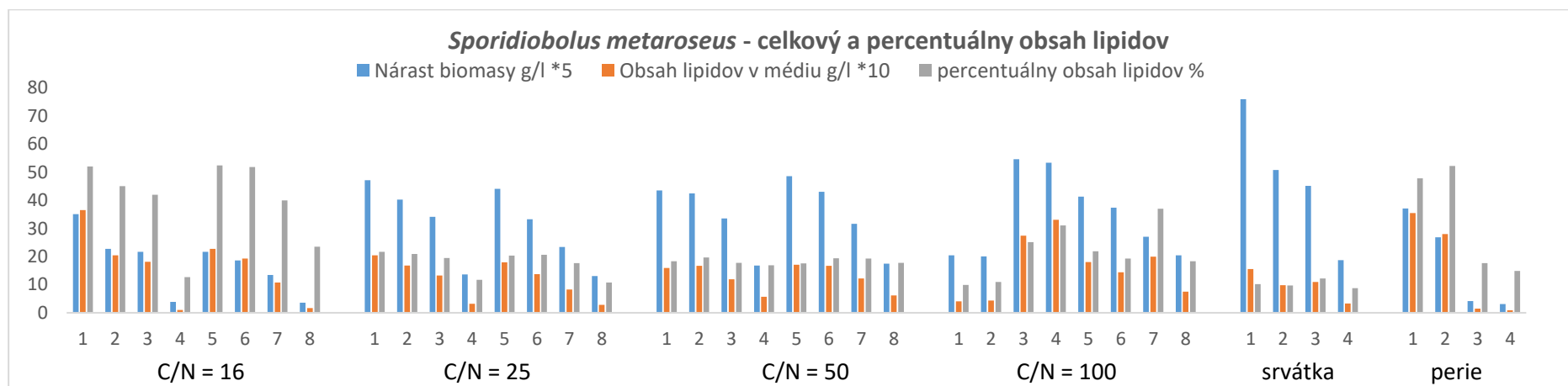
Graf 15 Diagramové zobrazenie pomeru mastných kyselín vyprodukovaných kvasinkou *S. salmonicolor* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou (1-4) a síranom amónnym (5-8) ako zdrojom dusíka, pri rôznych koncentráciách NaCl. Jednotlivé skupiny diagramu zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a posledné dve skupiny kultiváciu na srvátke a perí.



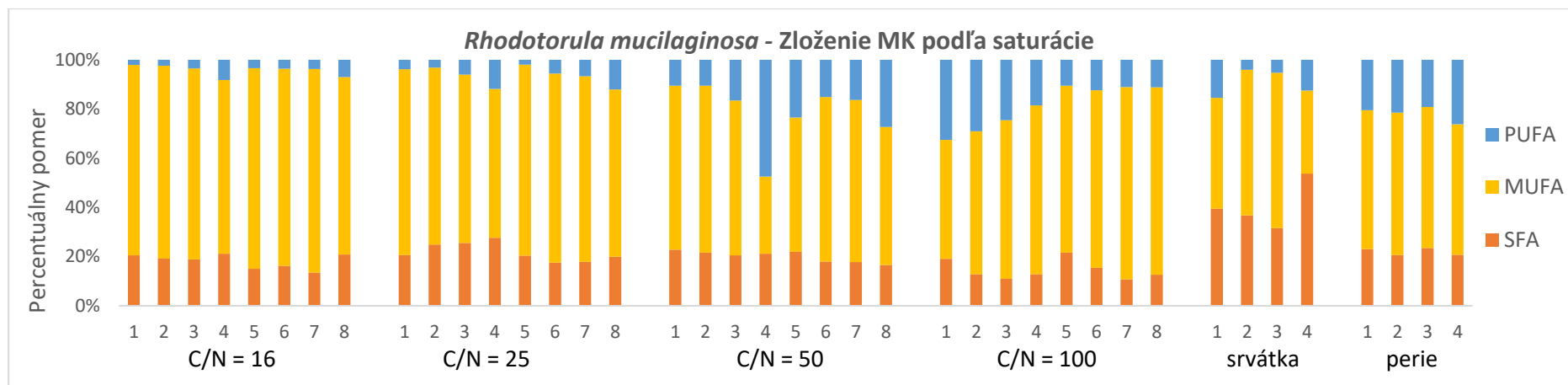
Graf 16 Histogram zobrazujúci vyprodukované lipidy a ich percentuálny obsah voči biomase kvasinkou *S. salmonicolor* na rôznych C/N pomeroch a odpadných substrátoch srvátke a perí. V rámci kultivácií sú zdroje dusíka močovina (1-4) a síran amónny (5-8) a rôzne koncentrácie NaCl.



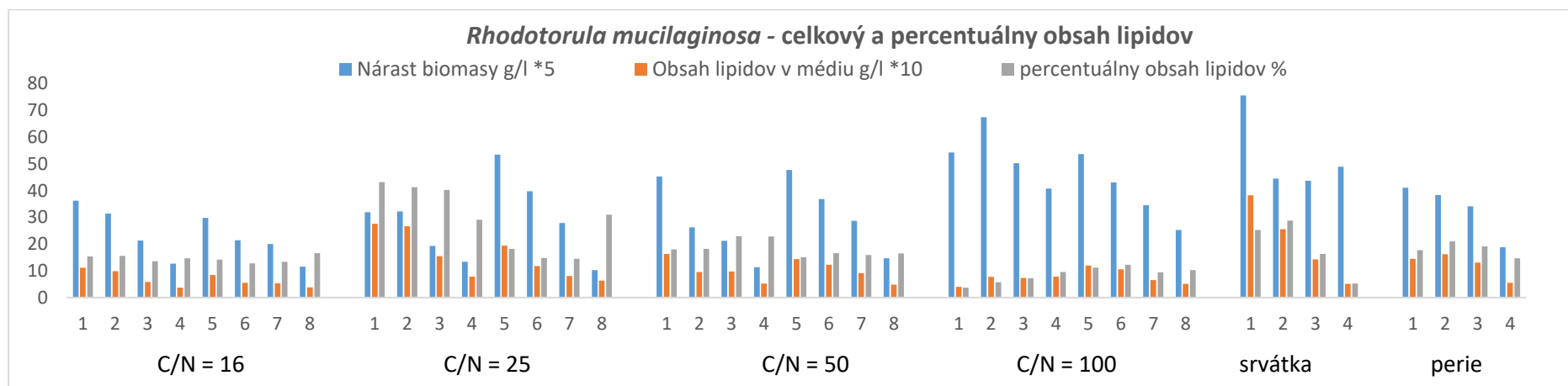
Graf 17 Diagramové zobrazenie pomeru mastných kyselín vyprodukovaných kvasinkou *S. metaroseus* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou (1-4) a síranom amónnym (5-8) ako zdrojom dusíka, pri rôznych koncentráciách NaCl. Jednotlivé skupiny diagramu zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a posledné dve skupiny kultiváciu na srvátke a perí.



Graf 18 Historgram zobrazujúci vyprodukované lipidy a ich percentuálny obsah voči biomase kvasinkou *S. metaroseus* na rôznych C/N pomeroch a odpadných substrátoch srvátke a perí. V rámci kultivácií sú zdroje dusíka močovina (1-4) a síran amónny (5-8) a rôzne koncentrácie NaCl.



Graf 19 Diagramové zobrazenie pomeru mastných kyselín vyprodukovaných kvasinkou *R. mucilaginosa* po 4 dňoch kultivácie na médiu s močovinou (1-4) a síranom amónnym (5-8) ako zdrojom dusíka, pri rôznych koncentráciách NaCl. Jednotlivé skupiny diagramu zobrazujú rôzne C/N pomer (16, 25, 50, 100) a posledné dve skupiny kultiváciu na srvátke a perí.



Graf 20 Histogram zobrazujúci vyprodukované lipidy a ich percentuálny obsah voči biomase kvasinkou *R. mucilaginosa* na rôznych C/N pomeroch a odpadných substrátoch srvátke a perí. V rámci kultivácií sú zdroje dusíka močovina (1-4) a síran amónny (5-8) a rôzne koncentrácie NaCl.



## 5.4 Stanovenie nárastu biomasy mikrorias

Priebežne odobrané vzorky z kultivácii rias boli merané na pH a absorbanciu, ktorá je indikátorom hustoty média a tak aj rastu buniek. Kvôli spotrebovaniu rôznych zdrojov dusíka sa po nejakom čase kultivácie menilo pH, čo je dôležitý faktor pre rast buniek. Znáznornenie hodnôt absorbancie a pH kriviek pre jednotlivé kultivácie je uvedené v Prílohách 7-11.

Močovina sa počas kultivácie využíva ako zdroj dusíku aj uhlíku, preto nevytvára medziprodukty a pH s jej použitím je stabilné v rozmedzí 6-7, ako je aj pH čistého BBM média.

Pri spotrebe dusičnanu sodného sa pH zvyšuje až na hodnotu 8, naopak so spotrebou síranu amónneho pH klesá až pod hodnotu 4.

Z pohľadu nárastu biomasy bol ako najvhodnejší zdroj dusíka sodný vyhodnotený dusičnan sodný pre *Chlorella sorokiniana* a *Coccomyxa*, močovina pre *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus dimorphus* a *Desmodesmus obliquus*. Na médiu so síranom amónnym ani jedna riasa neprosperovala dobre, nárasty boli výrazne nižšie, rovnako ako produkcia aktívnych látok.

## 5.5 Stanovenie produkcie aktívnych látok mikroriasami metódou HPLC

Analýzou HPLC boli vo vzorkách rias vyhodnocované obsahy látok:  $\beta$ -karotén, luteín, chlorofyl A a B, fytosterol a koenzým Q. Pomocou kalibračných rovníc pre jednotlivé látky boli obsahy prepočítané na mikrogramy na liter média. Oproti kvasinkám boli stanovené hodnoty  $\beta$ -karoténov nižšie a vo viacerých médiách sa ani nevyskytoval. Rovnako to bolo s obsahom fytosterolu a koenzýmu Q. Vo vzorkách rias CoQ nameraný nebol, jedine v stopových množstvách nerelevantných pre vyhodnotenie.

### 5.5.1 Druh *Chlorella sorokiniana*

Z grafu Graf 21 môže byť pozorované, že pre *Chlorella sorokiniana* bolo najlepšie médium na produkciu aktívnych metabolitov obsahujúce dusičnan sodný ako zdroj dusíka.

S médiom obsahujúcim močovinu vyprodukovala najviac chlorofylu A a luteínu. Neprodukovala žiadny  $\beta$ -karotén. V 23. dni kultivácie bol nameraný vysoký obsah celkových karotenoidov (5,3 mg/l). Koncentrácia fytosterolu bola vyššia ako pri médiu s dusičnanom sodným (2,8  $\mu$ g/l), čo mohlo znamenať potlačenie produkcie ostatných látok.

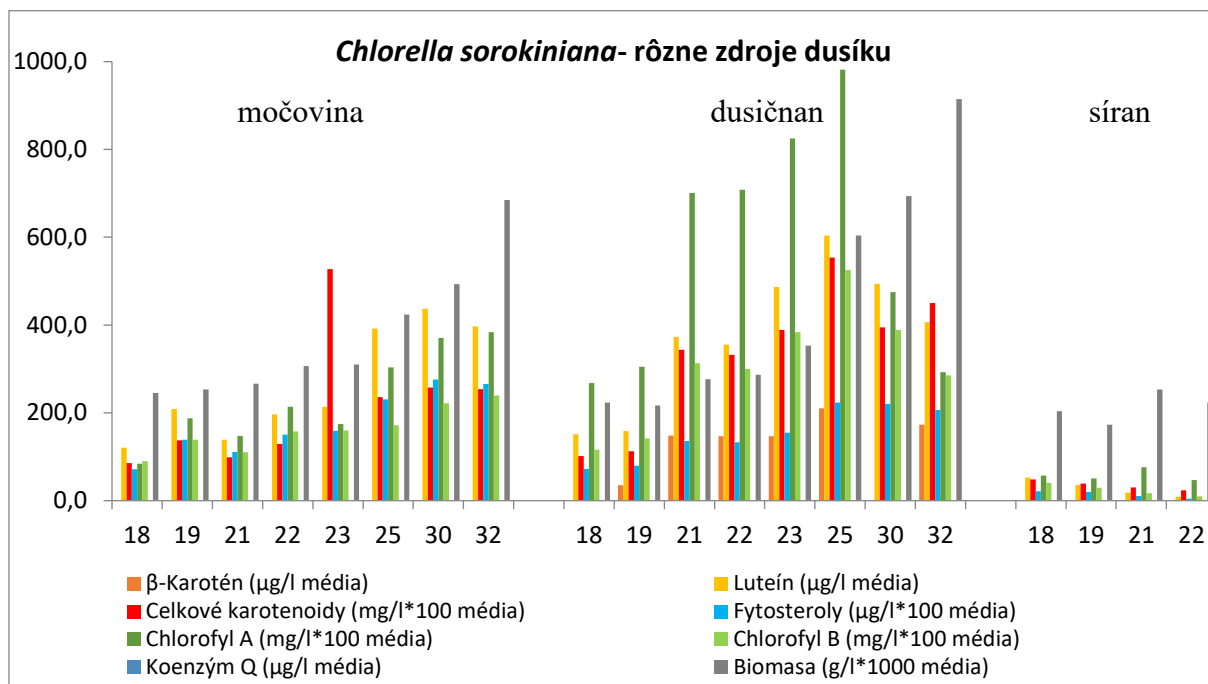
Na médiu s dusičnanom sodným bol výrazne produkovaný chlorofyl A (9,8 mg/l) a luteín vo väčších množstvách ako na médiu s močovinou. V tomto médiu bol produkovaný aj  $\beta$ -karotén. Najvyššia koncentrácia látok bola v 25. dni, neskôr už obsah látok začal klesať, čo bolo pravdepodobne spôsobené nedostatkom živín a nárastom koncentrácie metabolitov.

Síranové médium neposkytovalo dobré podmienky na rast ani produkciu aktívnych látok, čo zrejme spôsobilo ich výrazne menšiu koncentráciu a aj ukončenie rastu.

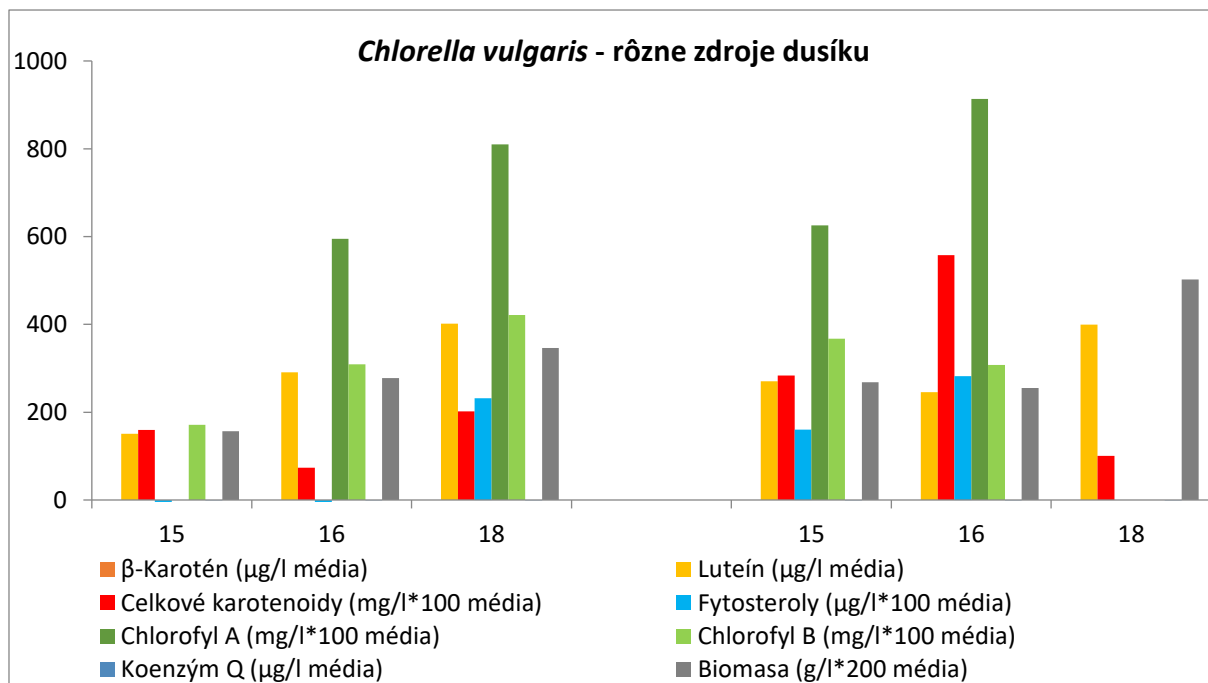
### 5.5.2 Druh *Chlorella vulgaris*

Z grafu Graf 22 vyplýva, že pre *Chlorella vulgaris* bolo médium s dusičnanom sodným o trochu priaznivejšie ako s močovinou. Miera produkcie jednotlivých látok bola veľmi podobná na médiu s močovinou aj dusičnanom sodným.  $\beta$ -karotén nebol vyprodukovaný ani na jednom médiu. Chlorofylu A obsahovalo médium 9,1 mg/l, karotenoidov 5,6 mg/l a fytosterolu 2,2  $\mu$ g/l.

Médium so síranom amónnym nebolo pre riasu vhodné a nárast nebol dostatočný na vytvorenie dostatočnej biomasy na analýzu.



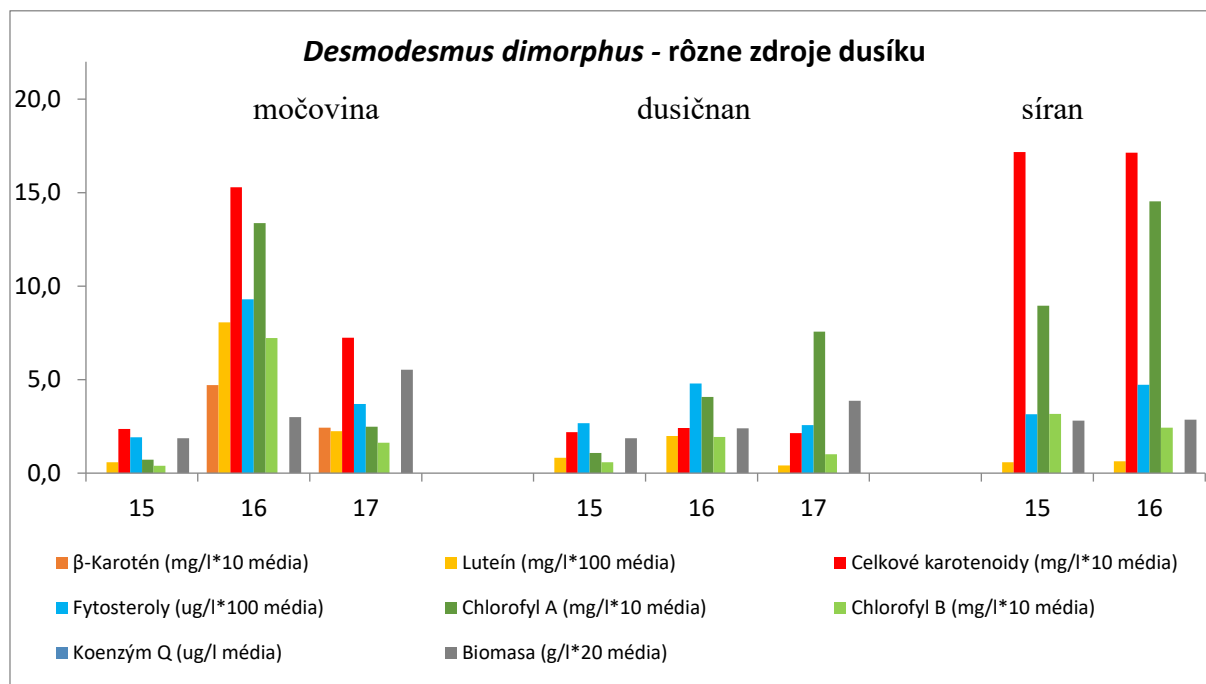
Graf 21 Histogram zobrazujúci vyprodukované aktívne látky mikroriasou *C. sorokiniana* v médiách zo zdrojmi dusíka – močovina, dusičnan sodný, síran amónny. V skupine histogramov je označené poradie dní kultivácie.



Graf 22 Histogram zobrazujúci vyprodukované aktívne látky mikroriasou *C. vulgaris* v médiách zo zdrojmi dusíka – močovina, dusičnan sodný, síran amónny. V skupine histogramov je označené poradie dní kultivácie.

### 5.5.3 Druh *Desmodesmus dimorphus*

Pre mikroriasu *D. dimorphus* podľa grafu Graf 23 bola najlepším zdrojom dusíka na produkciu aktívnych látok močovina. Síran amónny indukoval taktiež vysoký obsah karotenoidov (1,7 mg/l), ale chlorofylu A a B aj fytosterolu bolo menej. B-karotén bol nameraný iba na médiu s močovinou. V 16. deň kultivácie mikroriasy na médiu s močovinou bol obsah karotenoidov 1,5 mg/l, chlorofylu A 1,3 mg/l a fytosterolu 0,09 µg/l.



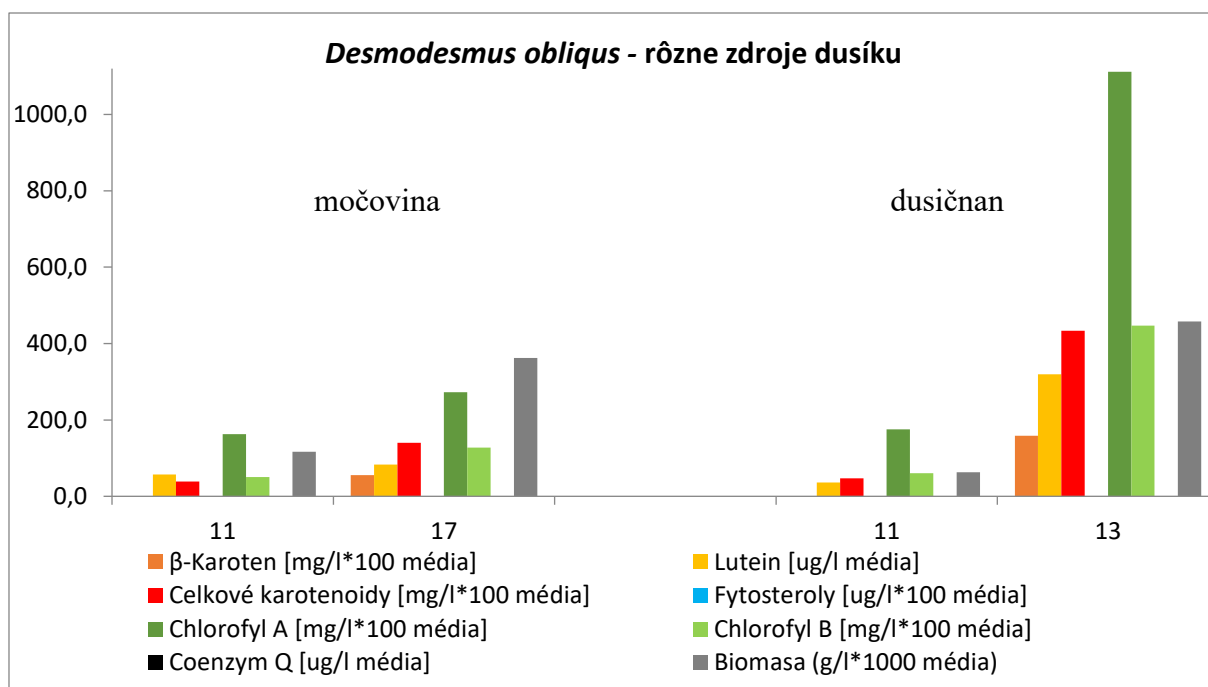
Graf 23 Histogram zobrazujúci vyprodukované aktívne látky mikroriasou *D. dimorphus* v médiách zo zdrojmi dusíka – močovina, dusičnan sodný, síran amónny. V skupine histogramov je označené poradie dní kultivácie.

### 5.5.4 Druh *Desmodesmus obliquus*

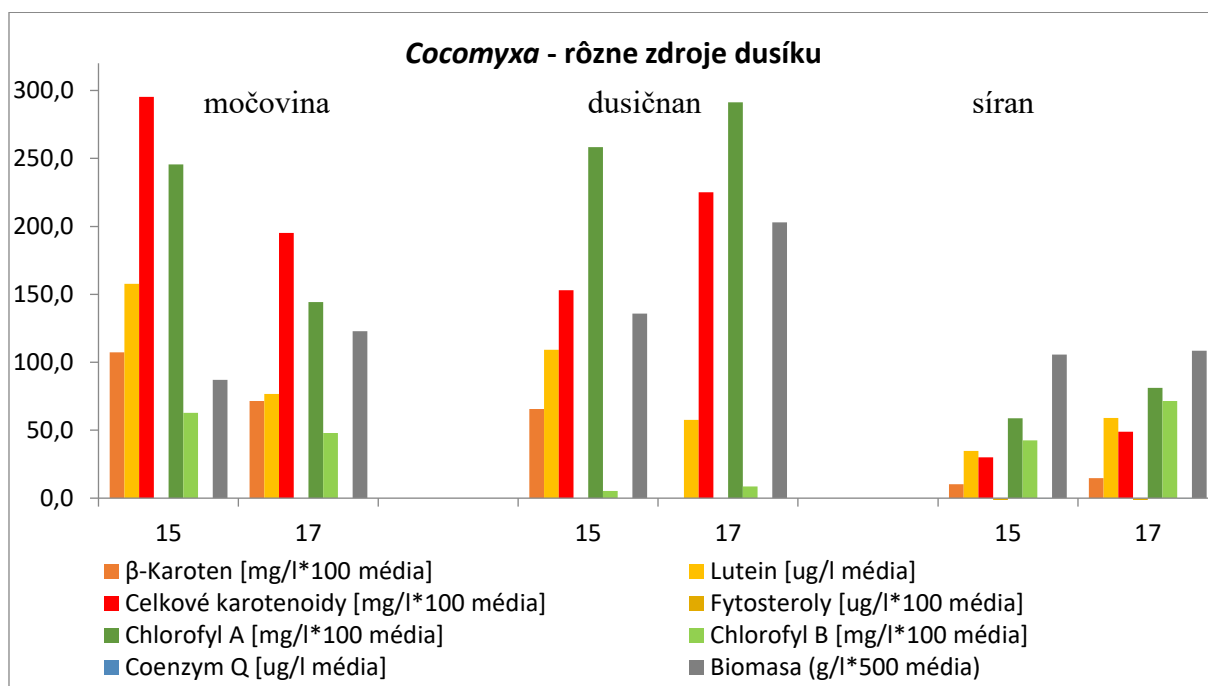
Z hľadiska produkcie aktívnych látok bol pre *D. obliquus* najvhodnejším zdrojom dusíka dusičnan sodný (Graf 24). Produktoval hlavne vysoký obsah chlorofylu A (11,1 mg/l). β-karotén a fytosterol neboli analýzou zistené ani na jednom zdroji. Síran amónny nepodporoval rast dostatočne, a tak nebolo získané dostatočné množstvo na porovnateľnú analýzu.

### 5.5.5 Rod *Coccomyxa*

Pre mikroriasu *Coccomyxa* boli zdroje dusíka močovina a dusičnan sodný porovnateľné (Graf 25). Nárast biomasy bol síce vyšší pri dusičnane sodnom, ale obsah látok na liter média je približne rovnaký. V médiu s močovinou bol vyšší obsah karotenoidov (2,9 mg/l) v 15. deň a v médiu so síranom amónnym bol v 17. deň vyšší obsah chlorofylu A (2,9 mg/l). Majoritný produkovaný karotenoid bol luteín, β-karotén stanovený nebol, rovnako ako fytosterol.



Graf 24 Histogram zobrazujúci vyprodukované aktívne látky mikroriasou *D. obliquus* v médiách zo zdrojmi dusíka – močovina, dusičnan sodný, síran amónny. V skupine histogramov je označené poradie dní kultivácie.



Graf 25 Histogram zobrazujúci vyprodukované aktívne látky mikroriasou *Coccomyxa* v médiách zo zdrojmi dusíka – močovina, dusičnan sodný, síran amónny. V skupine histogramov je označené poradie dní kultivácie.

## 5.6 Stanovenie produkcie lipidov mikroriasami metódou GC

Metódou plynovej chromatografie bol zisťovaný obsah lipidov v biomase nakultivovaných rias a ich profil podľa saturácie. Zistený obsah bol prepočítaný na jednotku 1 gram lipidov na 1 liter média.

### 5.6.1 Druh *Chlorella sorokiniana*

Pre saturáciu lipidov vyprodukovaných mikroriasou *C. sorokiniana* nemal zdroj dusíku zásadný význam (Graf 26). Médium s močovinou obsahovalo trochu vyšší pomer PUFA a menší SFA, najvýznamnejší pomer bol nameraný v 25. deň kultivácie (PUFA 60 %, MUFA 11 %, SFA 29 %). V médiu s dusičnanom sodným sa ku koncu kultivácie zvyšoval obsah mononenasýtených MK na úkor PUFA aj SFA. Médium so síranom amónnym dosiahlo najlepši profil v 19. dni, odvtedy sa saturácia zvyšovala.

Lipidov bolo celkovo vyprodukovaných viac na médiu s močovinou (5-20 %) (Graf 27). pri médiu s dusičnanom sodným obsah lipidov postupne rástol, až dosiahol 13 % obsahu sušiny. Médium so síranom amónnym obsahovalo najmenej lipidov. Kvôli väčšiemu nárastu buniek, najvyššiu produkciu dosiahla riasa na médiu s dusičnanom sodným – 0,12 g/l.

### 5.6.2 Druh *Chlorella vulgaris*

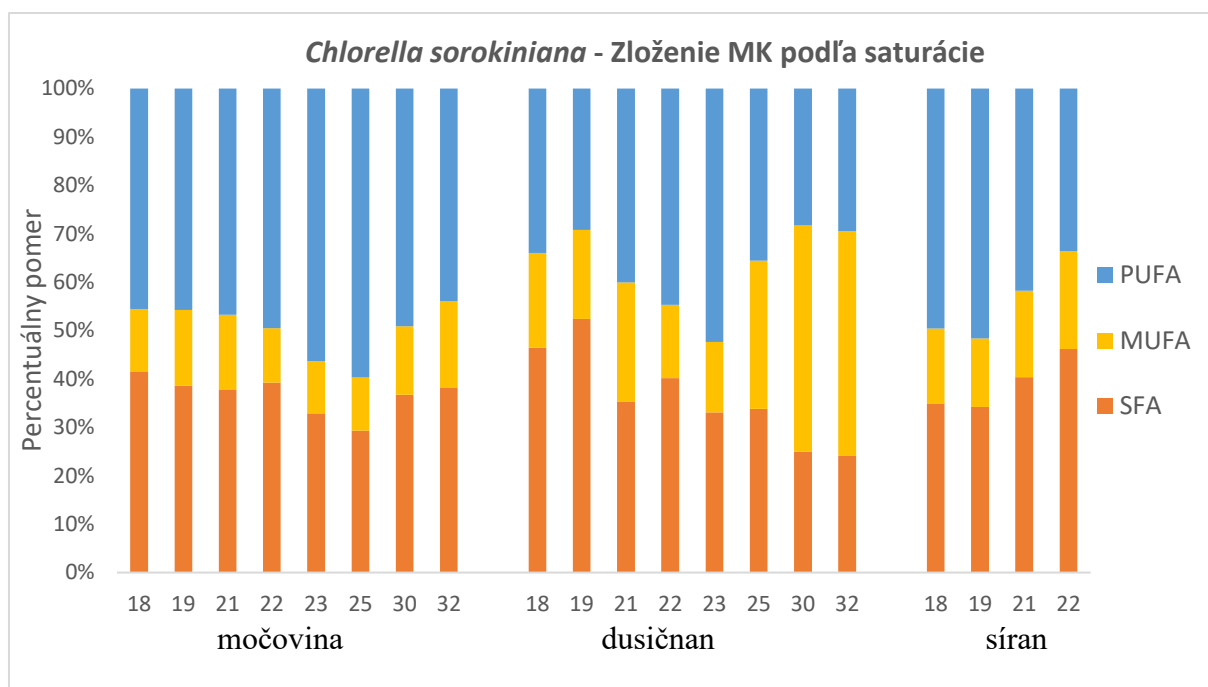
Profil saturácie lipidov v kultivácii *C. vulgaris* bol v oboch médiách veľmi podobný a stabilný (30 % PUFA, 51 % MUFA 19 % SFA), močovina indukovala vyšší obsah PUFA (Graf 28).

Rovnako aj množstvo produkovaných lipidov v sušine bolo na médiách podobné (40 %). Ale vďaka lepšiemu nárastu biomasy na médiu s dusičnanom sodným bol teda tento zdroj dusíka produktívnejší a v 18. deň kultivácie dosiahol hodnotu 0,09 g/l (Graf 29).

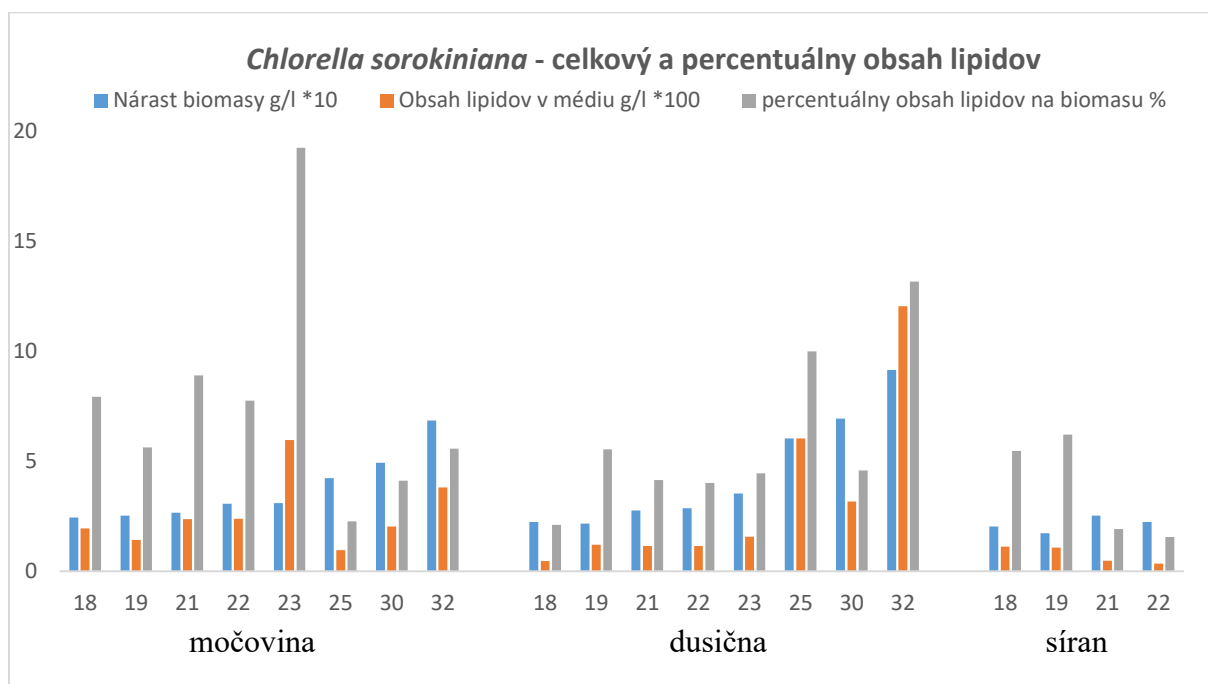
### 5.6.3 Druh *Desmodesmus dimorphus*

Z grafu Graf 30 vyplýva, že zdroj dusíka nemal na profil MK vplyv, ich podiel podľa saturácie bol PUFA 15-20 %, MUFA 30-45 %, SFA 30-50 %.

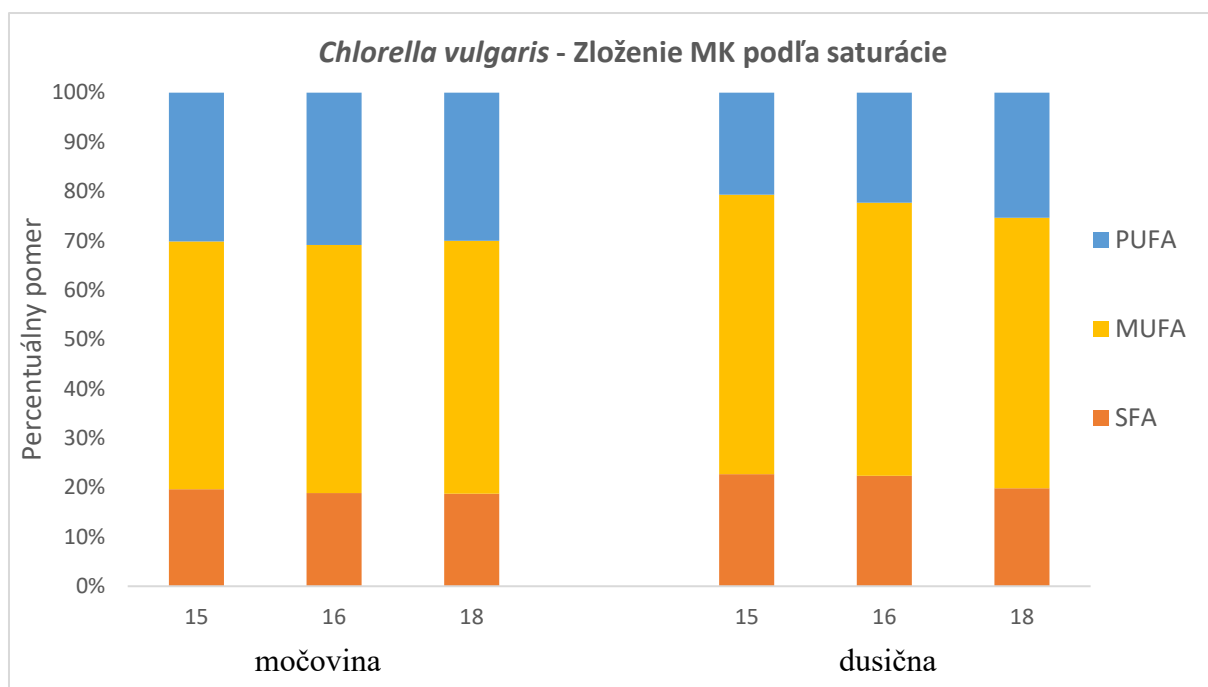
Najvyšší obsah lipidov v sušine bol dosiahnutý kultivovaním na médiu so síranom amónnym, a to 8 % (Graf 31). Rovnako na tomto médiu bola najvyššia produkcia na liter média – 0,01 g/l. Bol pozorovaný trend klesajúceho obsahu lipidov so stúpaním narastenej biomasy, čo mohlo byť spôsobené práve zvýšeným rastom a pomalšou syntézou lipidov



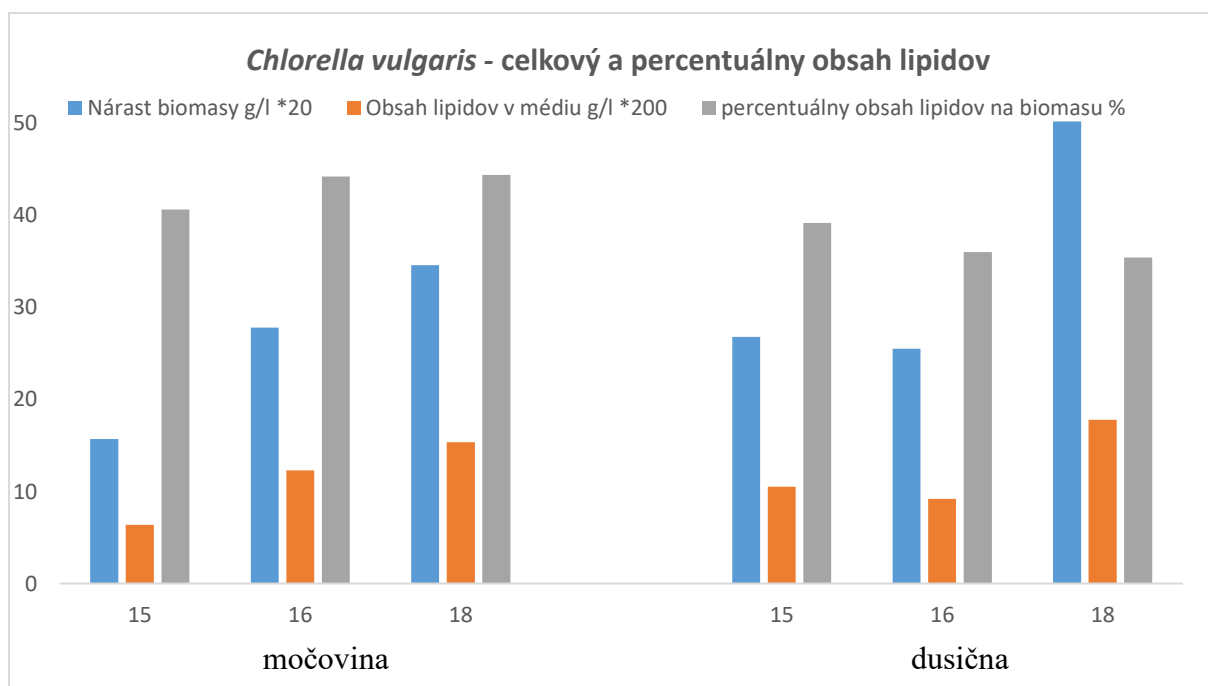
Graf 26 Diagramové zobrazenie percentuálneho rozdelenia mastných kyselín podľa saturácie, vyprodukovaných riasou *C. sorokiniana*. Skupiny stĺpcov predstavujú kultivácie na rôznych dusíkatých zdrojoch – močovina, dusičnan sodný, síran amónny a v rámci skupiny poradie dní kultivácie.



Graf 27 Histogram zobrazujúci celkový a percentuálny obsah lipidov vyprodukovaných *C. sorokiniana* na rôznych zdrojoch dusíka. Jednotlivé histogramy sú označené poradím dňa kultivácie.



*Graf 28 Diagramové zobrazenie percentuálneho rozdelenia mastných kyselín podľa saturácie, vyprodukovaných *C. vulgaris*. Skupiny stĺpcov predstavujú kultivácie na rôznych dusíkatých zdrojoch – močovina, dusičnan sodný, síran amónny a v rámci skupiny poradie dní kultivácie.*



*Graf 29 Histogram zobrazujúci celkový a percentuálny obsah lipidov vyprodukovaných *C. vulgaris* na rôznych zdrojoch dusíka. Jednotlivé histogramy sú označené poradím dňa kultivácie.*

#### 5.6.4 Druh *Desmodesmus obliquus*

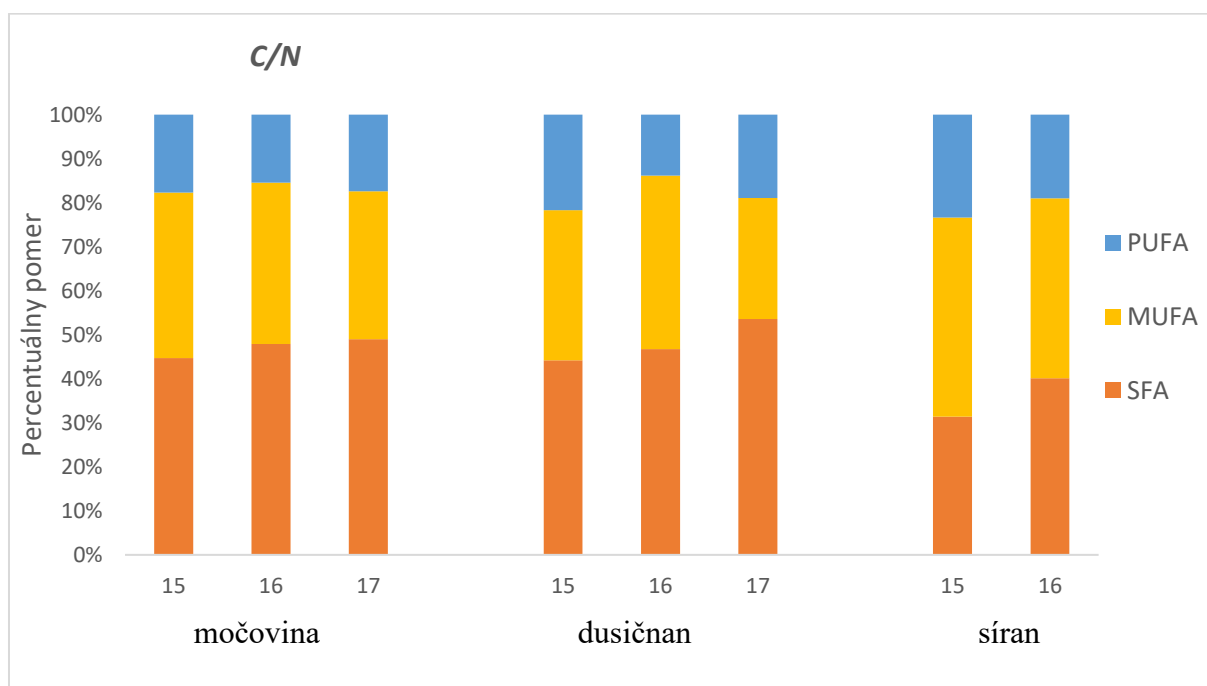
Profil mastných kyselín vyprodukovaných riasou *D. obliquus* bol značne nasýtený (Graf 32), s klesajúcou tendenciou počas dní kultivácie. Nebol pozorovaný výrazný rozdiel v analýze biomasy rastúcej na médiu s močovinou a dusičnanom sodným. Obsah lipidov podľa saturácie MK bol do 11 % PUFA, 40 % MUFA, 50-55 % SFA.

Vyššia produkcia lipidov, rovnako ako nárast, bol na médiu s dusičnanom sodným a na 13. deň bolo zaznamenané maximum produkcie – 0,03 g/l (Graf 33).

#### 5.6.5 Rod *Coccomyxa*

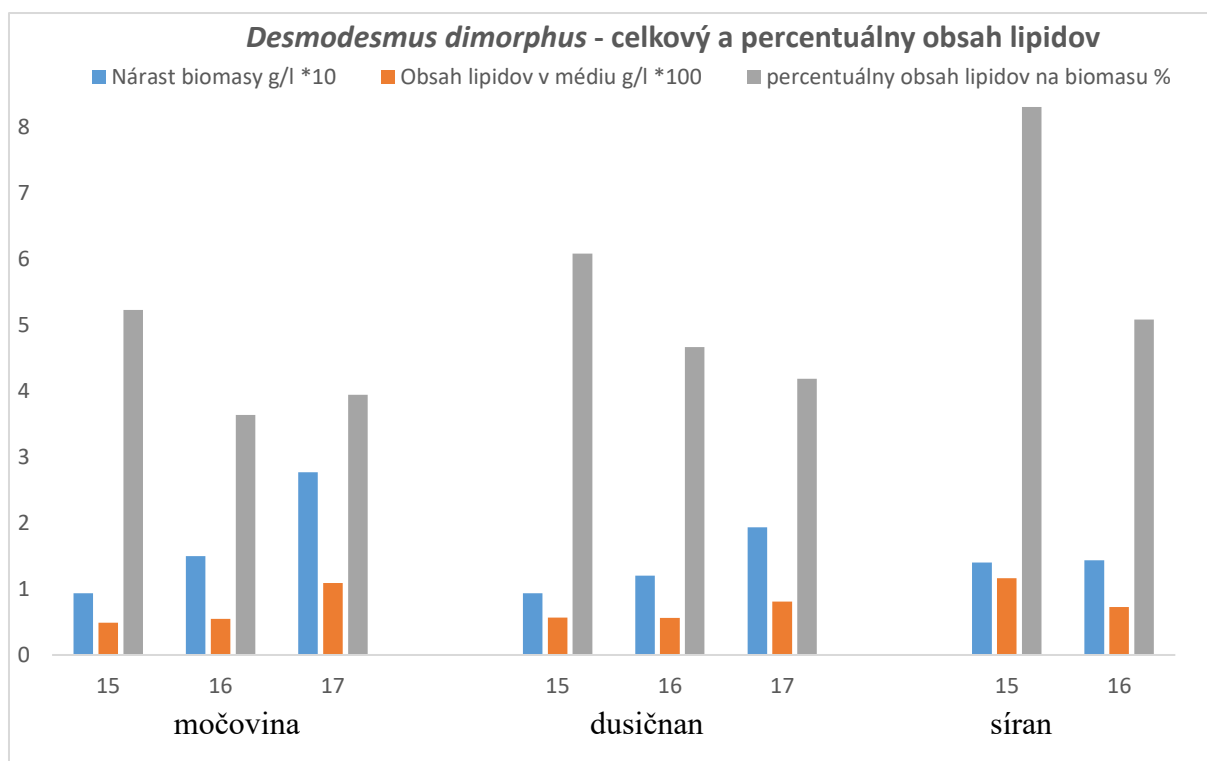
Profil mastných kyselín u mikroriasy *Coccomyxa* bol veľmi priaznivý (60-70 % PUFA, 3-10 % MUFA, 20-25 % SFA), médiá s dusičnanom sodným a močovinou mali na produkciu rovnaký vplyv, ale síran amónny ovplyvnil profil tak, že zvýšil mieru saturácie, a zároveň s jeho použitím bol aj nižší nárast buniek. (Graf 34).

Produkcia lipidov aj nárast biomasy bol najvyšší na médiu s dusičnanom sodným, maximum bolo 0,04 g/l (Graf 35).

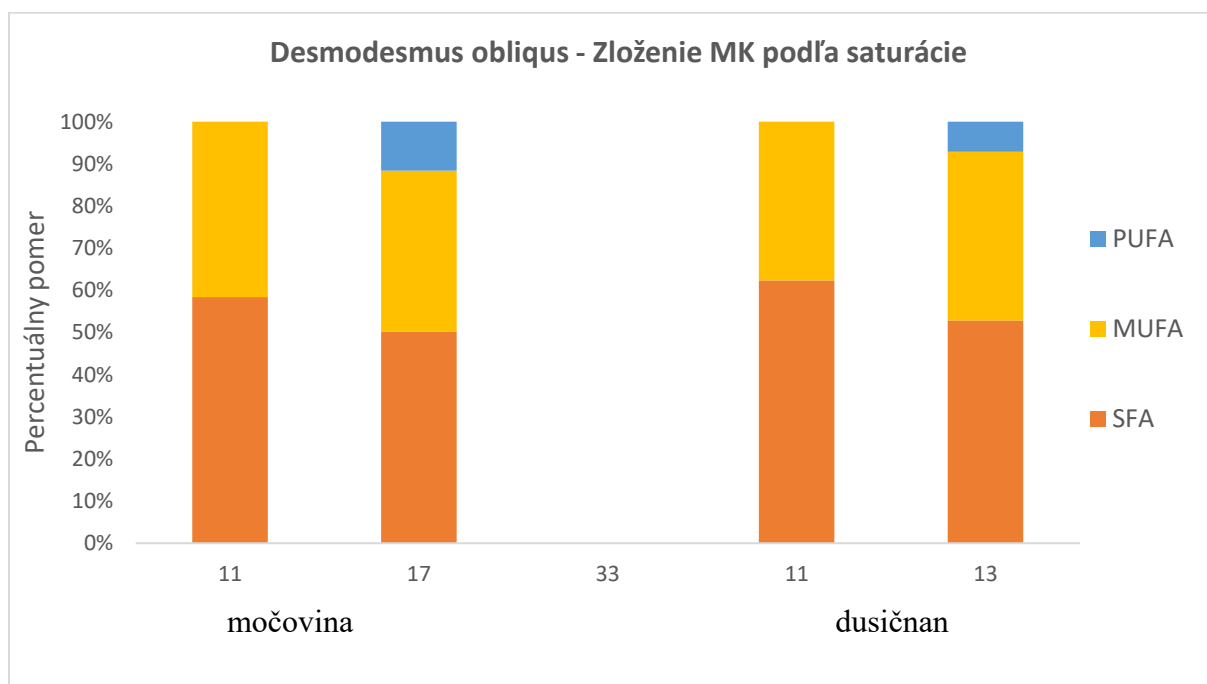


Graf 30 Diagramové zobrazenie percentuálneho rozdelenia mastných kyselín podľa saturácie, vyprodukovaných *D. dimorphus*. Skupiny stĺpcov predstavujú kultivácie na rôznych dusíkatých zdrojoch – močovina, dusičnan sodný, síran amónny a v rámci skupiny poradie dní kultivácie.

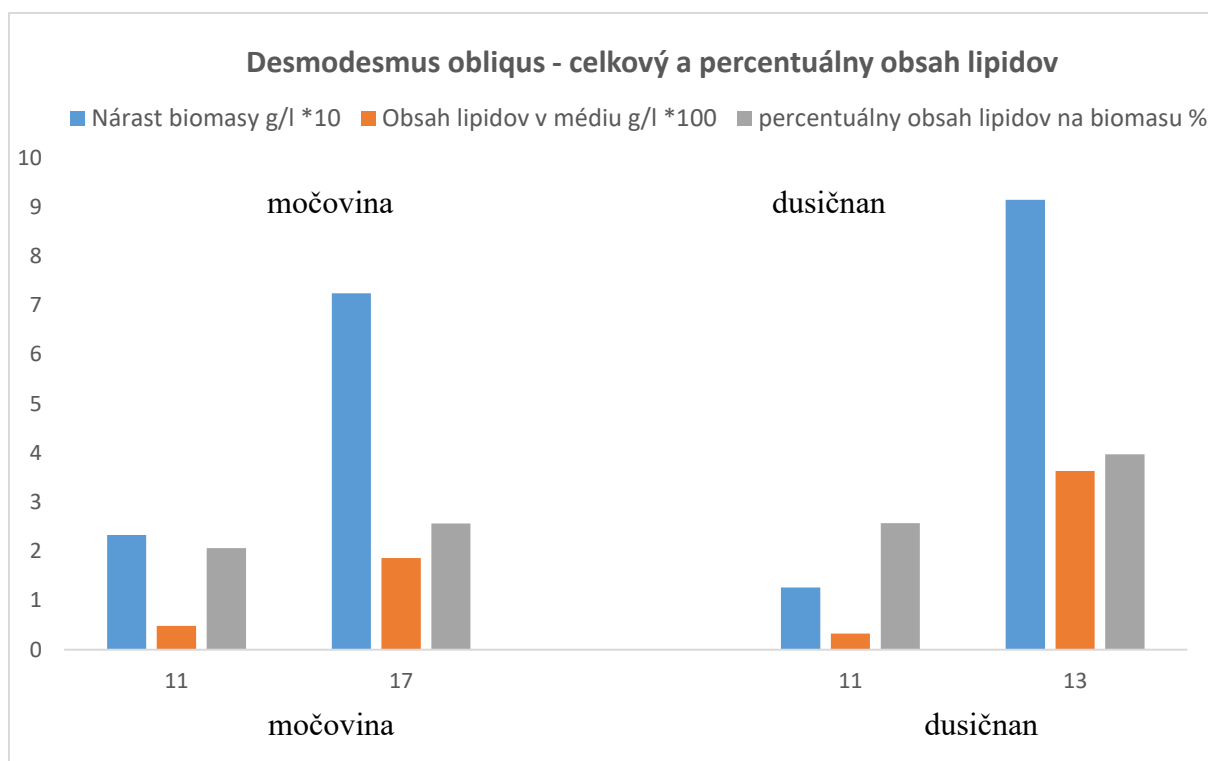




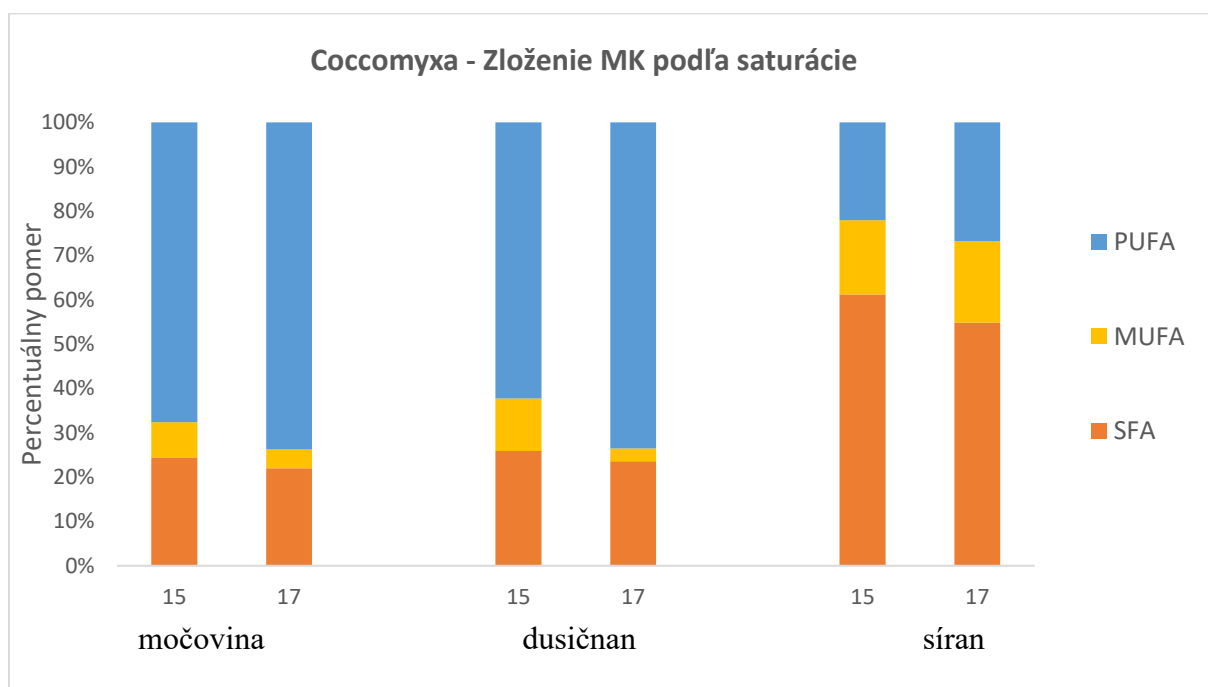
Graf 31 Histogram zobrazujúci celkový a percentuálny obsah lipidov vyprodukovaných riasou *D. dimorphus* na rôznych zdrojoch dusíka. Jednotlivé histogramy sú označené poradím dňa kultivácie.



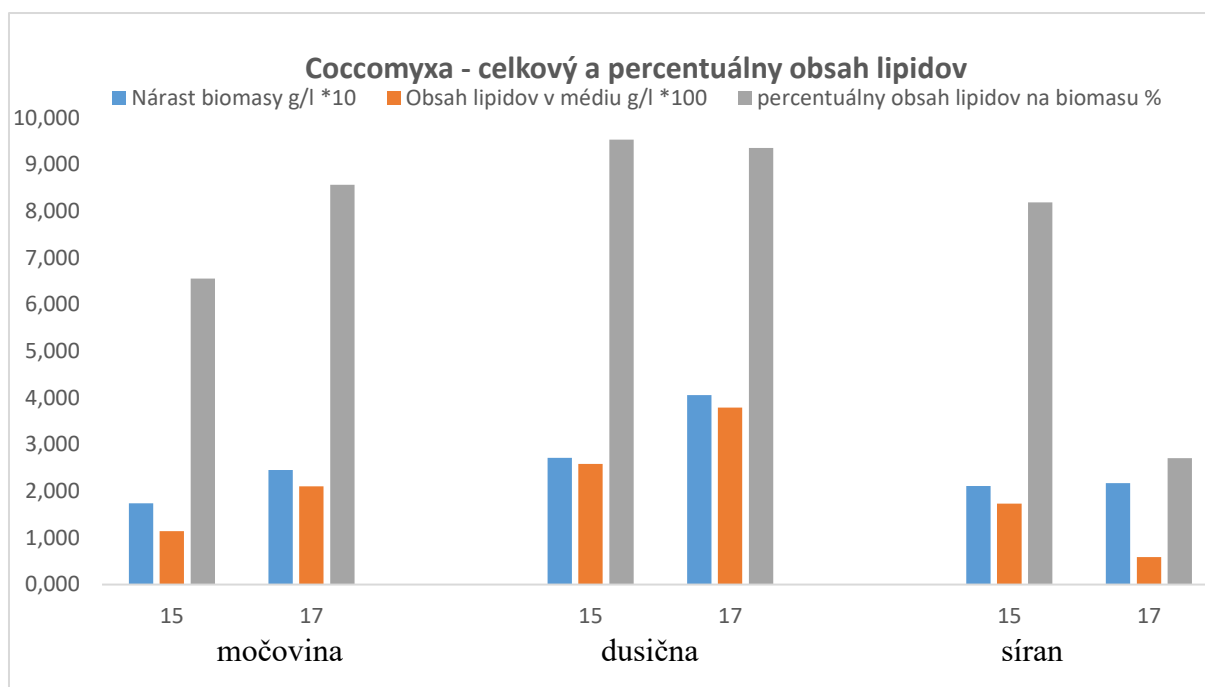
Graf 32 Diagramové zobrazenie percentuálneho rozdelenia mastných kyselín podľa saturácie, vyprodukovaných *D. obliquus*. Skupiny stĺpcov predstavujú kultivácie na rôznych dusíkatých zdrojoch – močovina, dusičnan sodný, síran amónny a v rámci skupiny poradie dní kultivácie.



Graf 33 Histogram zobrazujúci celkový a percentuálny obsah lipidov vyprodukovaných riasou *D. obliquus* na rôznych zdrojoch dusíka. Jednotlivé histogramy sú označené poradím dňa kultivácie.



Graf 34 Diagramové zobrazenie percentuálneho rozdelenia mastných kyselín podľa saturácie, vyprodukovaných riasou *Coccomyxa*. Skupiny stĺpcov predstavujú kultivácie na rôznych dusíkatých zdrojoch – močovina, dusičnan sodný, síran amónny a v rámci skupiny poradie dní kultivácie.



Graf 35 Histogram zobrazujúci celkový a percentuálny obsah lipidov vyprodukovaných riasou *Coccomyxa* na rôznych zdrojoch dusíka. Jednotlivé histogramy sú označené poradím dňa kultivácie.

## 5.7 Zhodnotenie vplyvu nutričných stresov na rast a produkciu látok

### 5.7.1 Kvasinky

*Cystofilobasidium infirmominiatum* mal najvyšší nárast pri C/N pomere 16 a lepším zdrojom dusíka bola preňho močovina. Koncentrácia soli ovplyvňovala rast negatívne. Srvátka sa ukázala ako výborný substrát na rast tohto kmeňa kvasinky, perie bolo tiež vhodné. Močovinnové médium indukovalo o trochu lepšiu mieru produkcie aktívnych látok ako síran amónny, srvátka menej a perie nebolo vhodné na ich produkciu. Dusíkatý zdroj neovplyvnil profil mastných kyselín, médium s C/N pomerom 16 a perie boli najvhodnejšie na syntézu PUFA. Celkovo najviac lipidov obsahovala sušina rastúca na C/N pomere 50 a ich obsah nebol ovplyvnený zdrojom dusíka ani koncentráciou soli.

*Sporidiobolus salmonicolor* rástol najlepšie na C/N pomere 16, síran amónny a močovina ako zdroje dusíka boli pre neho rovnocenné. Zvyšujúci sa obsah soli znižoval nárast. Srvátka bola vhodný substrát, zato perie kvasinke nevyhovovalo na rast ani produkciu látok. C/N pomer, ktorý najviac indukoval tvorbu aktívnych metabolitov bol 50 a zo zdrojov dusíka bola lepšia močovina. Látky boli v nižšej miere produkované aj na srvátke. Na profil mastných kyselín nemal zdroj dusíka vplyv, obsah soli zvyšoval obsah polynenasýtených MK, taktiež zvyšujúci sa pomer C/N. Na mieru syntézy lipidov mala vplyv soľ, ktorá ju znižovala. Kultivácie na srvátke a perí dosiahli podobné obsahy aj profil lipidov ako s použitím médií.

*Sporidiobolus metaroseus* preferoval na rast pomer C/N 16, zdroje dusíka močovina a síran amónny mu vyhovovali podobne. Koncentrácia soli rast spomaľovala. Kvasinka rástla dobre aj na srvátke a hydrolyzáte peria. Na produkciu aktívnych látok bolo vhodnejšie médium so síranom, srvátka bola vhodná, ale perie neumožňovalo kvasinke vyprodukovať metabolity.

Profil mastných kyselín bol rovnaký s použitím močoviny aj síranu, so zvyšujúcim sa pomerom C/N sa zvyšoval obsah PUFA, rovnako ako so zvýšenou koncentráciou NaCl. Srvátka a perie oproti rozpustným médiám nezmenilo profil MK. Syntéza lipidov bola ovplyvnená obsahom soli nerovnomerne, ale najviac lipidov obsahovali kultivácie na perí a C/N pomere 16.

*Rhodotorula mucilaginosa* ako všetky skúmané druhy kvasiniek rástla najlepšie na C/N pomere 16, močovina a síran amónny pre ňu boli rovnako vhodné zdroje dusíku a zvýšená koncentrácia soli spomaľovala rast. Tvorbu pigmentov a aktívnych metabolitov viac podporoval síran amónny, ale srvátka sa ukázala ako najlepšia zo skúmaných substrátov. Miera vyprodukovaných látok na substráte z peria sa vyrovnala použitým rozpustným médiám. Profil produkovaných MK bol pri rôznych zdrojoch dusíka podobný, srvátka zvyšovala saturáciu, ale perie naopak podporovalo produkciu PUFA najviac. Vyšší C/N pomer znižoval saturáciu MK. Tvorba lipidov bola najvyššia pri pomere C/N 25, obsah soli ani zdroj dusíku na ňu vplyv nemali.

### 5.7.2 Mikroriasy

*Chlorella sorokiniana* rástla najviac na médiu s dusičnanom sodným. Toto médium aj podporovalo vyššiu produkciu aktívnych látok. Médium s močovinou zase umožnilo väčšiu produkciu polynenasýtených MK a celkovo lipidov, avšak z dôvodu vyššieho nárastu na dusičnanovom médiu bol nakoniec dosiahnutý vyšší obsah lipidov na liter média.

*Chlorella vulgaris* rástla na dusičnanovom aj močovinovom médiu podobne, aj tvorba lipidov bola na médiách rovnaká. Dusičnan sodný vytváral lepšie podmienky na tvorbu aktívnych látok, ale močovina zvyšovala podiel PUFA.

*Desmodesmus dimorphus* lepšie prijímal ako zdroj dusíka močovinu z pohľadu rastu aj syntézy aktívnych metabolitov. Dusičnanové médium obsahovalo viac vyprodukovaných lipidov, a ich profil bol s použitím močoviny, dusičnanu sodného aj síranu amónneho rovnaký.

*Desmodesmus obliquus* rástol rýchlejšie aj produkoval viac látok na médiu s dusičnanom sodným. Profil mastných kyselín bol nameraný ako najviac nasýtený zo všetkých druhom rias, v rovnakej miere s použitím dusičnanu sodného aj močoviny. Viac lipidov však bolo produkovaných na médiu s dusičnanom sodným.

*Coccomyxa* rástla najrýchlejšie na médiu s dusičnanom sodným, s produkciou aktívnych látok boli dusičnan sodný aj močovina vyrovnané. Profil mastných kyselín bol ovplyvnený použitím média so síranom amónnym tak, že zvýšil ich saturáciu, medzi močovinou a dusičnanom sodným v nasýtenosti rozdiely neboli. Najviac lipidov bolo produkovaných na médiu s dusičnanom sodným.

## 6 ZÁVER

Cieľom práce bolo analyzovať vplyv rôznych nutričných podmienok na karotenogénne mikroorganizmy, hlavne zdroj dusíku.

V úvode bola spracovaná teoretická časť zaoberajúca sa sledovanými metabolitmi karotenogénnych kvasiniek a mikrorias, opísané charakteristiky jednotlivých používaných kmeňov a odpadných substrátov. Bola zhrnutá teória ku používanej analytickej metóde – chromatografii.

V experimentálnej časti boli kultivované štyri druhy kvasiniek na rôznych médiách z hľadiska obsahu a zastúpenia nutričných látok. Bol analyzovaný vplyv pomeru uhlíka k dusíka, zdroj dusíka a rôzna koncentrácia NaCl na rast a produkciu významných látok. Ďalej boli použité na kultiváciu aj dva odpadné substráty, a to enzymaticky hydrolyzovaná srvátka a bázičský hydrolyzáť peria. V druhej časti práce bolo kultivovaných aj päť druhov mikrorias na médiách s rôznym zdrojom dusíka a rovnako analyzovaný vplyv na rast a tvorbu aktívnych metabolitov.

Série kultivácii ukázali, že pre skúmané druhy kvasiniek bola z pohľadu nárastu viacej vyhovujúca močovina ako zdroj dusíka. Na produkciu pigmentov a aktívnych látok mala vo väčšine prípadov tiež lepší vplyv. Zdroj dusíku neovplyvnil produkciu ani profil lipidov.

Koncentrácia soli všeobecne znižovala nárast biomasy, a takisto produkciu žiadúcich metabolitov s výnimkou niektorých kombinácií, kedy indukovala tvorbu koenzýmu Q. Na obsah lipidov mala negatívny vplyv, ale na profil mastných kyselín buď vplyv nemala, alebo zvyšovala podiel polynenasýtených mastných kyselín. Soľ zvyšuje osmotický tlak a znižuje aktivitu vody, čo rastu kvasiniek neprospieva.

Najlepší zo skúšaných pomerov C/N pre rast biomasy bol vo všetkých prípadoch C/N pomer 16, na tvorbu aktívnych látok vyhovoval druhom *S. metaroseus* a *C. infirmominiatum*, pre *R. mucilaginosa* bol najlepší C/N 25 a pre *S. salmonicolor* C/N 50. Pomer C/N ovplyvňoval profil mastných kyselín – zvyšoval podiel PUFA. Najvyššiu tvorbu lipidov mal každý druh pri inom C/N pomere.

Srvátka ako odpadný substrát použitý na kultiváciu kvasiniek dosiahol u všetkých druhov najvyššie nárasty. Tvorbu aktívnych látok indukovala v dostatočnej miere, pri *R. mucilaginosa* dokonca bola ich tvorba jedna z najlepších. Hydrolyzáť peria bol horším substrátom, najmä v prípade *S. salmonicolor*. Kvasinky na ňom rástli v menšej miere a iba *R. mucilaginosa* bola schopná produkovať relevantné množstvo látok. Neúspech peria ako substrátu mohol byť spôsobený relatívne vyšším obsahom NaCl, ktorý bol v médiu prítomný po neutralizácii pH kyselinou chlorovodíkovou. Oba odpadné substráty indukovali profil mastných kyselín podobný priemerným hodnotám na médiách s rozpustnými substrátmi.

Z porovnávaných zdrojov dusíka u mikrorias sa dá jednoznačne povedať, že síran amónny nebol veľmi vhodný na ich rast z dôvodu rýchlo klesajúceho pH. Mikroriasy *C. sorokiniana*, *D. obliquus* a *Coccomyxa* rástli lepšie na médiu s dusičnanom sodným, *D. dimorphus* na médiu s močovinou a pri *C. vulgaris* nebol v raste rozdiel. Viac aktívnych látok bolo vyprodukovaných druhmi *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* a *D. obliquus* na dusičnane sodnom, *D. dimorphus* na močovine a *Coccomyxa* mala mieru produkcie rovnakú na oboch médiách. Zdroj dusíka na profil mastných kyselín buď nemal vplyv, alebo u kmeňa *Chlorella* zvyšovala obsah

PUFA močovina. Celkovú produkciu lipidov podporoval viac dusičnan sodný ako ostatné zdroje dusíka.

Produkcia aktívnych látok a lipidov kvasinkami mala oproti riasam výhodu v rýchlosti rastu, vyšších koncentráciách biomasy aj vyprodukovaných látok na liter média a možnosti využiť organické odpadné substráty. Riasy na druhú stranu vyžadujú lacné anorganické zdroje živín a oxid uhličitý, ktorý je v dnešnej dobe tiež odpadnou látkou.

Budúce skúmanie tejto problematiky by sa mohlo zamerať na optimalizáciu zloženia srvátky, vývoj vhodnejšej metódy hydrolyzovania peria a možnú kultiváciu na zmesi odpadných substrátov s požadovaným pomerom C/N.

## 7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] *Vlastnosti karotenoidů* (online) (cit. apríl 2018). Dokument dostupný na stránce: [http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch\\_karotenoids.htm](http://hplc1.sweb.cz/Carotenoids/ch_karotenoids.htm)
- [2] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vydání. Praha: Academia, 2002. 506 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [3] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4. TAKÁČSOVÁ, M., Příbela, A.: *Chémia potravín*, STU Bratislava, 1993
- [4] BUHAESCU, Irina a Hassane IZZEDINE. *Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications*. Clinical Biochemistry (online). 2007, 40(9-10), 575-584 (cit. 2019-05-25). DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912007001403>.
- [5] ČAČKOVÁ, Katarína. *Využití různých nutričních zdrojů vybranými karotenogenními kvasinkami* (online). Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010.
- [6] HÁRONIKOVÁ, A. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů* (online). Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010.
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s.
- [8] *Colourings* (online). (cit. apríl 2018). Dokument dostupný na stránce: [http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene\\_colourings.html](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_colourings.html)
- [9] WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 0471964468.
- [10] HLAVÁČKOVÁ, Markéta. *Analytické možnosti stanovení luteinu, beta karotenu a zeaxantinu v potravinách*. Hradec Králové, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [11] KURIYAN, John, Boyana KONFORTI a David WEMMER. *The molecules of life: physical and chemical principles*. New York: Garland Science, c2013. ISBN 978-0-8153-4188-8.
- [12] STEFELY, Jonathan A. a David J. PAGLIARINI. *Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis*. Trends in Biochemical Sciences (online). 2017, 42(10), 824-843 (cit. 2019-05-15). DOI: 10.1016/j.tibs.2017.06.008. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000417301160><http://www.westerdijkins.titute.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeast%20species&Name=Cystofilobasidium%20infirmitum&Fields=All&ExactMatch=T>
- [13] BENDER, David A. *Nutritional biochemistry of the vitamins*. 2nd ed. New York, N.Y.: Cambridge University Press, c2003. ISBN 0521803888.
- [14] SZOTKOWSKI, M. *Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [15] FRAGNER, Jiří. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1961.
- [16] LIEBERMAN, Michael a Alisa PEET. *Marks' essentials of medical biochemistry: a clinical approach*. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, c2015. ISBN 978-1-4511-9006-9.
- [17] COY, Johannes F. a Maren FRANZ. *Výživou proti rakovině: jak zastavit rakovinový gen*. Praha: Ikar, 2010. ISBN 978-80-249-1450-3.
- [18] BUCHANAN, Bob B., Wilhelm GRUISSEM a Russell L. JONES. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, c2000. ISBN 978-0-943088-39-6.

- [19] TAKÁČSOVÁ, M., Příbela, A.: *Chémia potravín*, STU Bratislava, 1993
- [20] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Principles of biochemistry*:
- [21] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu základních živin u člověka*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-2976-6.
- [22] KURTZMAN, Cletus P. ; FELL, Jack W. *The Yeasts, A Taxonomie Study*. 4. vydání. Amsterdam : ELSEVIER, 1998. 1074 s. ISBN 0-444-81312-8.
- [23] VALENTOVÁ, L. *Charakterizace jednotlivých fází kultivace karotenogenních kvasinek* (online). Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. 2017.
- [24] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A. a kol.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*, Academia Praha, 1986
- [25] *Cystofilobasidium infirmominiatum* (online). (cit 20.5.2019) Dostupné z: [https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm\\_keyword?AN=Cystofilobasidium&BN=infirmominiatum&CN=&DN=](https://www.jcm.riken.jp/cgi-bin/jcm/jcm_keyword?AN=Cystofilobasidium&BN=infirmominiatum&CN=&DN=)
- [26] WIRTH, Fernanda a Luciano Z. GOLDANI. Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* (online). 2012, 2012, 1-7 (cit. 2019-05-11). DOI: 10.1155/2012/465717. ISSN 1687-708X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2012/465717/>
- [27] HÁRONIKOVÁ, A. *Regulácia produkcie obohatenej biomasy a lipidových látok u karotenogénnych kvasiniek* (online). Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2008.
- [28] BATT, Carl A. a Mary Lou TORTORELLO, ed. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-384730-0.
- [29] *Rhodotorula mucilaginosa* (online). (cit. 20.5.2019) Dostupné z : <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/rhodotorula-mucilaginosa>
- [30] POULÍČKOVÁ, Aloisie. *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2001. ISBN 80-244-0242-4.
- [31] KADUKOVÁ, Jana, RUDZANOVÁ D., LUKAVSKÝ J. *Charakteristika rias využívaných v biometalurgii a environmentálních biotechnologiích*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3735-2.
- [32] *Culture collection of autotrophic organisms*. (online). Dostupné z: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/search/node/sorokiniana> (cit. 20.5.2019)
- [33] *Chlorella: Uses, Side Effects, Interactions, Dosage, and Warning* (online). [www.webmd.com](http://www.webmd.com), (cit. 20.5.2019).
- [34] LÜRLING, M. *Phenotypic plasticity in the green algae Desmodesmus and Scenedesmus with special reference to the induction of defensive morphology*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* (online). 2003, 39(2), 85-101 (cit. 2019-05-25). DOI: 10.1051/limn/2003014. ISSN 0003-4088. Dostupné z: <http://www.limnology-journal.org/10.1051/limn/2003014>
- [35] NEMJOVÁ, Katarína. *Taxonómia rodu Coccoomyxa s.l. a výskyt týchto organismov v terestrických epifytických mikrobiotopoch ČR*; školitel Jiří Neustupa (online). 2007 (cit. 20.5.2019)
- [36] KABÁT, M. *Krmiva z odpadových surovin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1959.
- [37] BELITZ, H.-D, W. GROSCH a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009. ISBN 978-3-540-69934-7.
- [38] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie II*. Brno: Vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-214-0659-3.
- [39] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [40] *BBM medium*.(online) (cit. 20.5.2019). Dostupné z: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/bbm-medium>



## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PUFA – polynenasýtené mastné kyseliny  
MUFA – mononenasýtené mastné kyseliny  
SFA – nasýtené mastné kyseliny  
IPP – isopentenylpyrofosfát  
DMAPP – dimethylallylpyrofosfát  
HMG-CoA –  $\beta$ -hydroxy-methylglutaryl-CoA  
GPP – geranylpyrofosfát  
GGPP – geranylgeranylpyrofosfát  
CoQ – koenzým Q  
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia  
GC – plynová chromatografia  
UV – ultrafialové žiarenie  
PDA – detektor diódového poľa  
GC – plynová chromatografia  
FID – plameňovo-ionizačný detektor

## 9 PRÍLOHY

*Príloha 1 Rast biomasy C. infirmominiatum na médiu s rôznymi zdrojmi dusíku a C/N pomeru*

	Biomasa (g/l)			
Médium	C/N=16	C/N=25	C/N=50	C/N=100
1	5,65	8	4,99	5,46
2	7,66	5,24	2,83	5,18
3	10,03	3,6	1,65	3,13
4	5,1	3,54	1,30	0,70
5	8,26	9,22	4,55	4,28
6	7,19	3,46	2,72	3,56
7	7,57	3,96	1,72	2,54
8	4,02	0,2	1,83	0,61

*Príloha 2 Rast biomasy S. salmonicolor na médiu s rôznymi zdrojmi dusíku a C/N pomeru*

	Biomasa (g/l)			
Médium	C/N=16	C/N=25	C/N=50	C/N=100
1	10,89	6,32	9,84	4,16
2	9,15	4,7	10,30	4,09
3	6,56	0,56	7,66	2,98
4	1,84	7,24	0,80	1,11
5	9,91	6,1	8,33	5,83
6	10,98	5,02	7,77	3,83
7	7,25	2,94	6,03	2,95
8	2,24		1,73	1,33

*Príloha 3 Rast biomasy S. metaroseus na médiu s rôznymi zdrojmi dusíku a C/N pomeru*

	Biomasa (g/l)			
Médium	C/N=16	C/N=25	C/N=50	C/N=100
1	4,09	8,7	9,43	7,01
2	4,01	8,48	8,05	4,54
3	10,92	6,7	6,81	4,33
4	10,66	3,36	2,72	0,78
5	8,25	9,72	8,82	4,33
6	7,47	8,6	6,65	3,72
7	5,41	6,32	4,68	2,69
8	4,09	3,5	2,61	0,72

Príloha 4 Rast biomasy *R. mucilaginosa* na médiu s rôznymi zdrojmi dusíku a C/N pomeru

	Biomasa (g/l)			
Médium	C/N=16	C/N=25	C/N=50	C/N=100
1	10,85	9,05	6,39	7,25
2	13,49	5,24	6,45	6,28
3	10,03	4,24	3,85	4,27
4	8,15	2,27	2,68	2,54
5	10,72	9,54	10,69	5,95
6	8,62	7,36	7,95	4,28
7	6,91	5,73	5,58	4,00
8	5,05	2,93	2,05	2,32

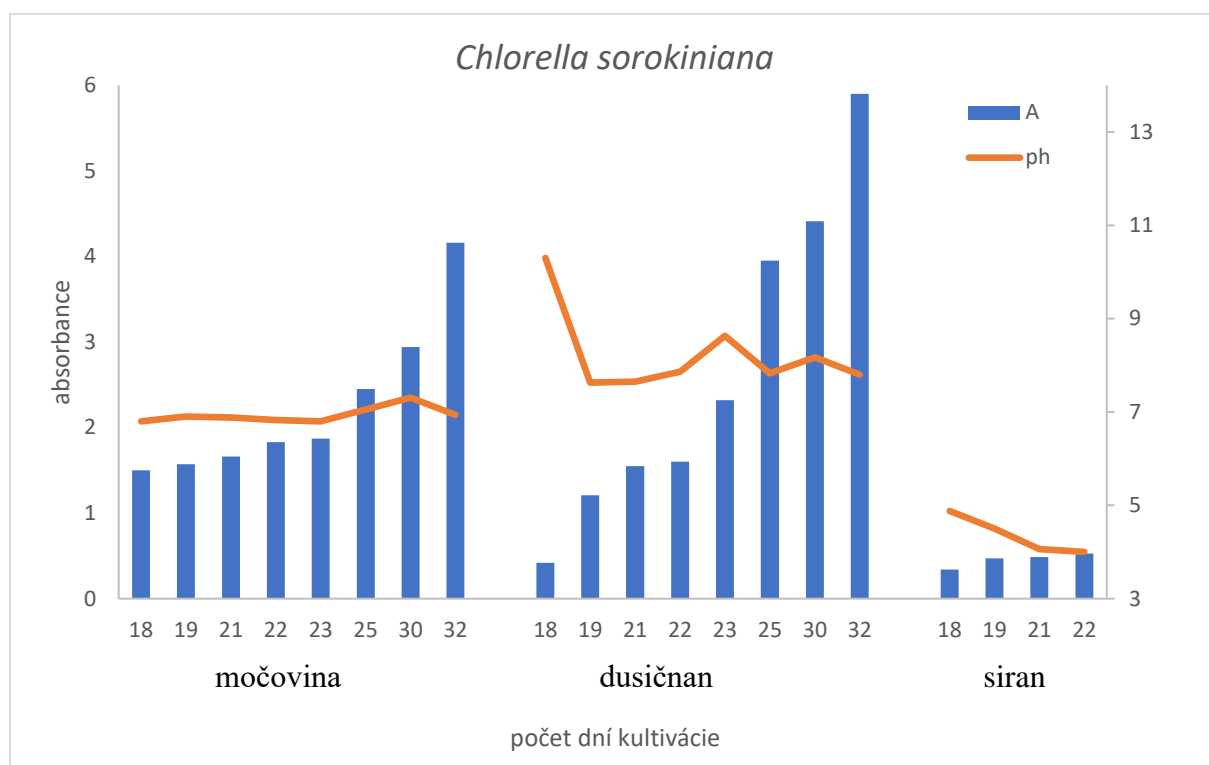
Príloha 5 Rast biomasy u sledovaných kvasiniek na médiu so srvátkou a NaCl

	Biomasa (g/l)			
Médium	<i>C. infirmominiatum</i>	<i>S. salmonicolor</i>	<i>S. metaroseus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
1	17,57	15,67	14,96	14,90
2	10,45	12,68	10,11	8,77
3	10,29	11,25	8,88	8,62
4	9,18	8,74	3,69	9,68

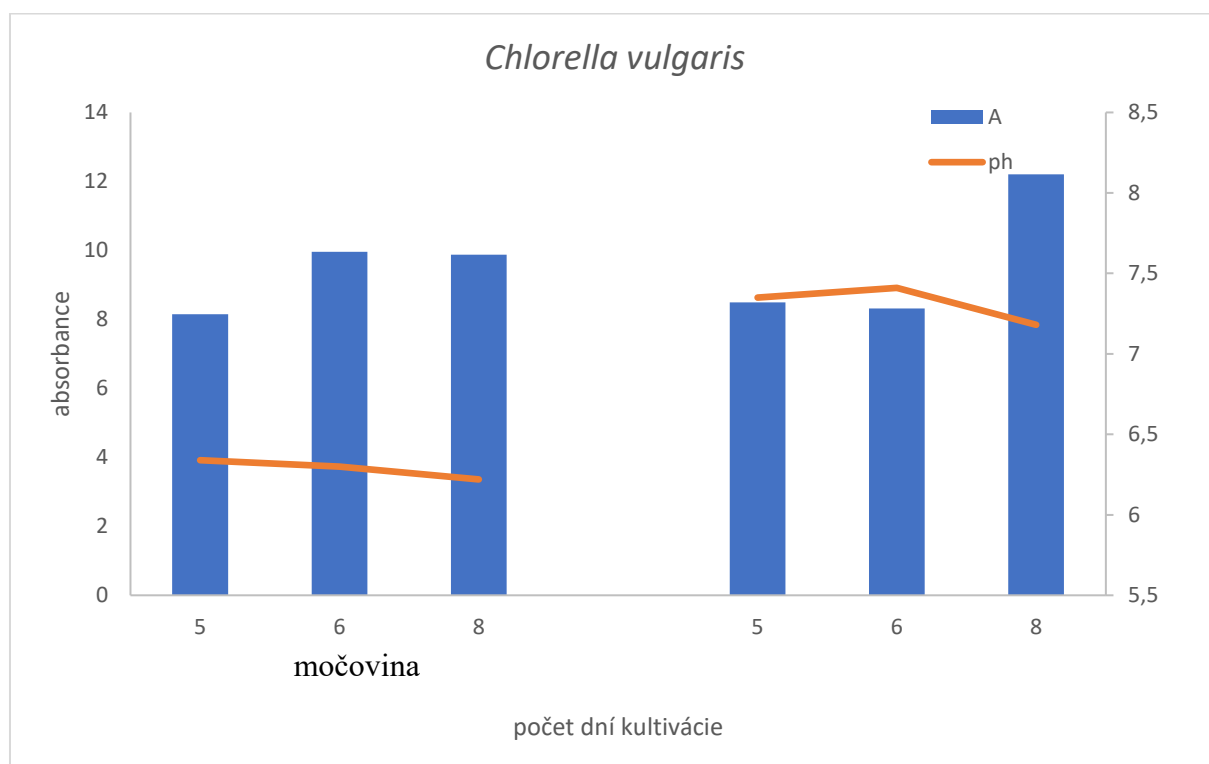
Príloha 6 Rast biomasy u sledovaných kvasiniek na médiu s perím a NaCl

	Biomasa (g/l)			
Médium	<i>C. infirmominiatum</i>	<i>S. salmonicolor</i>	<i>S. metaroseus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
1	6,01	2,10	7,42	8,21
2	5,49	0,99	5,36	7,67
3	0,53	1,28	0,84	6,83
4	0,36	0,91	0,63	3,76

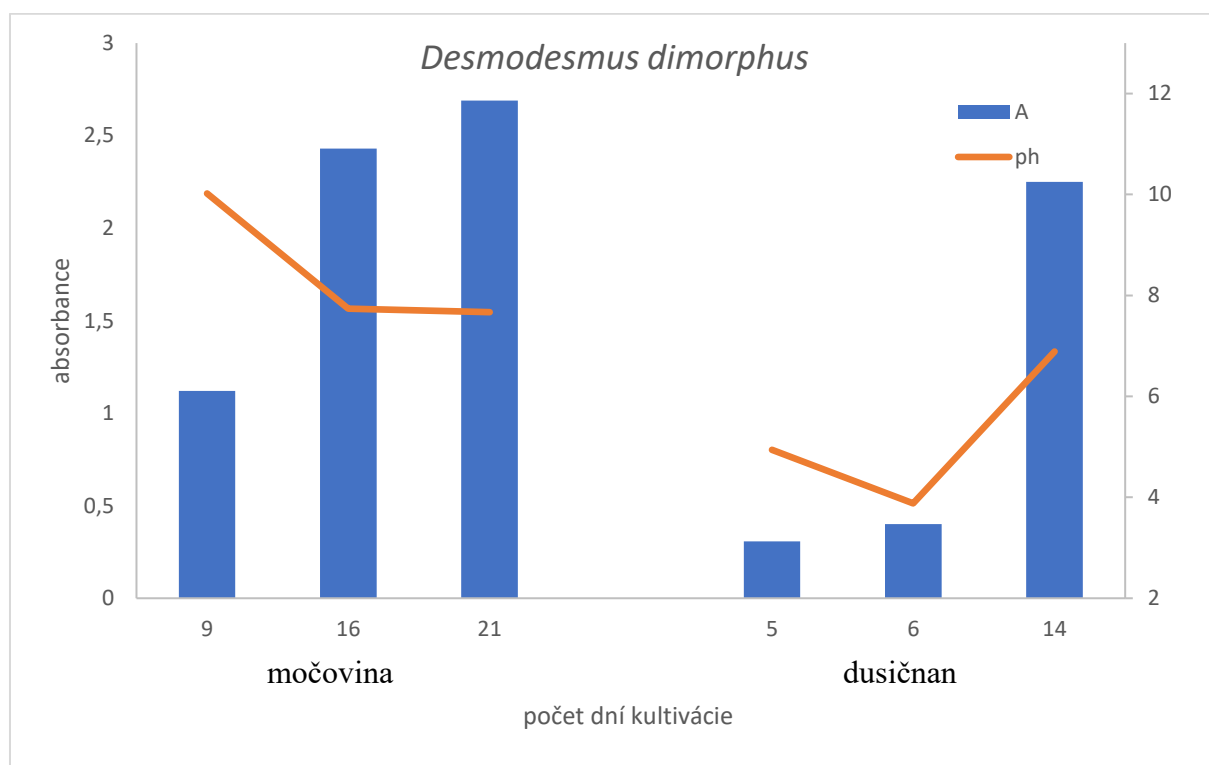
Príloha 7 Rast mikrorias na médiu s rôznym zdrojom dusíka



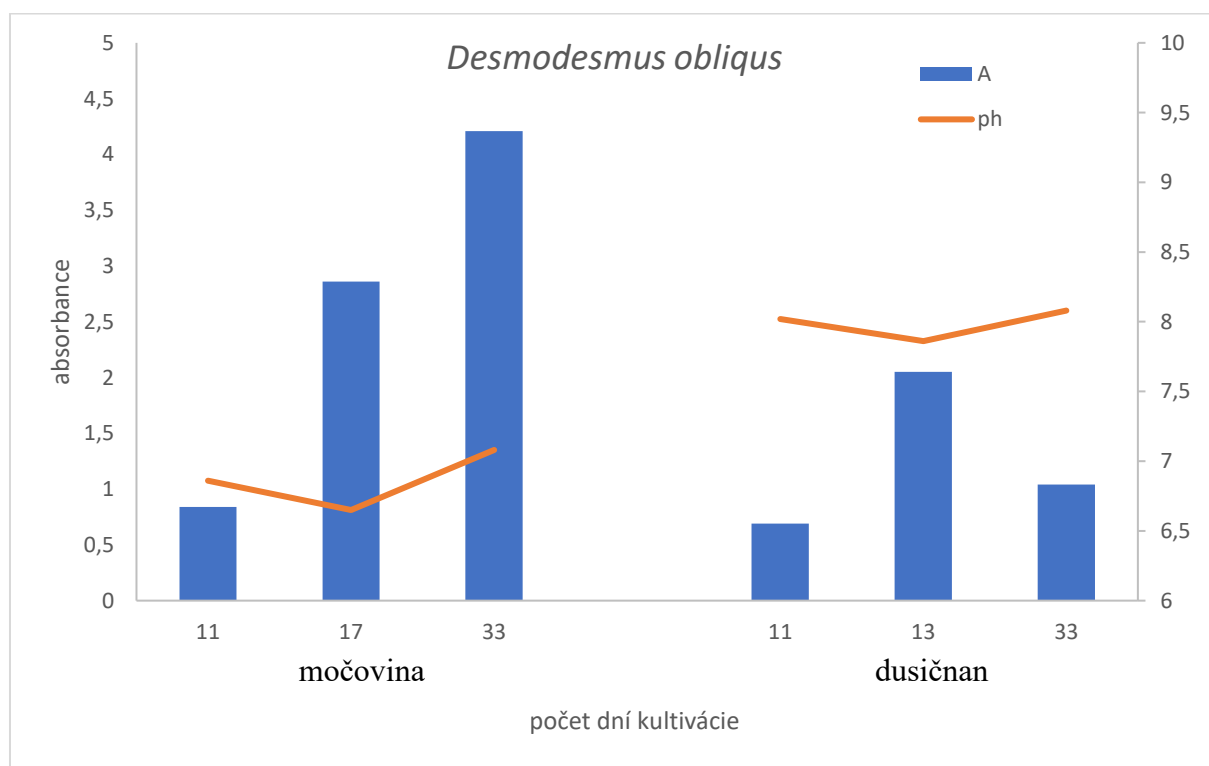
Príloha 8 Rast mikrorias na médiu s rôznym zdrojom dusíka



Príloha 9 Rast mikrorias na médiu s rôznym zdrojom dusíka



Príloha 10 Rast mikrorias na médiu s rôznym zdrojom dusíka



*Príloha 11 Rast mikrorias na médiu s rôznym zdrojom dusíka*

